

Gislaine Olescowicz

**EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E PRÓ-
NEUROGÊNICO DA AGMATINA EM UM MODELO DE
ESTRESSE INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO
CRÔNICA DE CORTICOSTERONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Coorientadora: Dra. Patrícia de Souza Brocardo

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Olescowicz, Gislaine
EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E PRÓ-NEUROGÊNICO DA
AGMATINA EM UM MODELO DE ESTRESSE INDUZIDO PELA
ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA / Gislaine
Olescowicz ; orientador, Ana Lúcia Severo
Rodrigues, coorientador, Patrícia de Souza
Brocardo, 2017.
118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

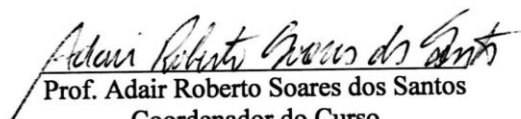
1. Neurociências. 2. Depressão. 3. Neurogênese.
4. Agmatina. I. Severo Rodrigues, Ana Lúcia . II.
de Souza Brocardo, Patrícia . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Neurociências. IV. Título.

GISLAINE OLESCOWICZ

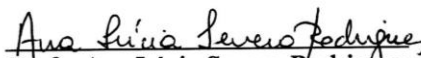
**“EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E PRÓ-
NEUROGÊNICO DA AGMATINA EM UM MODELO DE
ESTRESSE INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO
CRÔNICA DE CORTICOSTERONA”**


Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

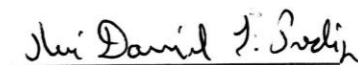
Florianópolis, 22 de fevereiro de 2017.

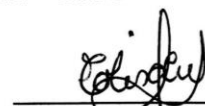

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso


Banca Examinadora:


Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Orientadora – UFSC


Dra. Ana Paula Costa
Membro externo ao Programa


Prof. Rui Daniel S. Prediger
Membro - UFSC


Profa. Elisa Cristiana W. Duarte
Membro externo ao Programa


Prof. Fernando F. Melleu
Membro - suplente

*Dedico este trabalho às pessoas que me
inspiraram profissionalmente e a minha
família*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Lúcia e Raul, pelo amor, apoio incondicional em todos os momentos até aqui, e por acreditarem e torcerem por mim sempre. Por colocarem a minha formação pessoal e profissional em primeiro lugar em suas vidas. Certamente o esforço de vocês nem se compara ao pequeno passo que estou dando. Essa conquista não somente é dividida com vocês, como é de vocês! Espero chegar um dia perto de ser o exemplo de pessoas que vocês são. Amo-os demais!

Ao meu querido irmão Dieison, por me fazer voltar a ter 12 anos de idade quando estamos perto e me fazer sentir, que mesmo que isso nem sempre seja possível, estar em família ainda é o melhor que há. Quero que saiba que apesar das brigas e implicâncias, acredito muito no teu potencial e te amo muito!

Á querida orientadora Ana Lúcia, primeiramente por me acolher em seu laboratório e acreditar em mim. Agradeço imensamente sua dedicação, ensinamentos e conselhos, mas principalmente, por fazer tudo isso de uma maneira tão gentil e agradável. Levarei comigo muito aprendizado destes dois anos e serei muito grata sempre por toda a paciência que teve!

Á querida coorientadora Patrícia Brocardo, por sempre me atender prontamente e pacientemente em toda e qualquer dúvida. Por ser pra mim um exemplo de mulher e profissional forte e decidida! Certamente peça fundamental neste trabalho!

Á Joana Gil-Mohapel, por ter sido tão prestativa em me auxiliar na técnica de imunohistoquímica e nas correções do paper. Pelo exemplo de simplicidade e praticidade.

Ao Fernando Melleu, por me atender prontamente, auxiliar na técnica de Sholl e me passar um pouco do seu conhecimento de uma maneira tão simples.

Às professoras, sem o apoio das quais eu jamais teria sequer entrado no mestrado. Obrigada: Simone Molz e Fabiana K. Ludka, pelos ensinamentos, preparo e incentivo, por acreditarem no meu potencial e não desistirem nunca! Vocês são meus exemplos!

Aos alunos do laboratório de Neurobiologia da Depressão, certamente TODOS, de alguma maneira contribuíram para minha formação. Aprendi muito com o convívio com cada um de vocês! Obrigada: Aline, Maurício, Francis, Priscila, Morgana, Andiará, André, Júlia, Luis, Mauren, Dayane, Pamyla. Em especial, gostaria de agradecer por terem me “adotado” no laboratório e pela enorme paciência: á Vivi, por me guiar desde o início, me passar vários ensinamentos sobre agmatina e por ser essa pessoa iluminada e fofa. Á Daiane Fraga, por ser meu “glutamato” e este anjinho no meu caminho. Pelos inúmeros socorros prestados no inglês e na escrita e pelas doses diárias de otimismo.

Aos colegas de disciplinas, pela aflição e conhecimento compartilhado.

Aos amigos de fora do laboratório, pelos momentos de descontração, risos, cervejas e incentivo. Vocês também foram parte importante neste período!

A todos os professores da Pós-graduação do CCB, que dedicam suas vidas para tornar pessoas em grandes profissionais, por terem contribuído muito para minha formação e processo de aprendizado.

Aos animais experimentais utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

Á CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A neurogênese adulta encontra-se diminuída em pacientes com depressão e tem se demonstrado que a resposta comportamental a fármacos antidepressivos é dependente do aumento da neurogênese. A agmatina é uma amina endógena cuja administração exógena apresenta ação antidepressiva em roedores e humanos. O presente estudo investigou o efeito do tratamento crônico com agmatina em um modelo animal de estresse induzido pela administração crônica de corticosterona em camundongos, assim como seus efeitos sobre a proliferação celular, diferenciação neuronal e complexidade dendrítica no hipocampo. A administração crônica de corticosterona (20 mg/kg, p.o., 21 dias) aumentou o tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda (TSC), efeito que foi revertido pela co-administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o., 21 dias) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o., 21 dias – controle positivo), mas não causou comportamento anedônico no teste de borrifagem de sacarose (TBS) teste. Devido à correlação entre depressão e ansiedade, avaliamos o comportamento ansioso dos animais na arena do campo aberto. A administração crônica de corticosterona não alterou o comportamento tipo-ansioso dos animais, porém a agmatina apresentou um efeito ansiolítico, evidenciado pelo aumento no número de entradas no centro do campo aberto. Considerando as evidências na literatura quanto ao aumento da neurogênese promovida pela administração crônica de antidepressivos convencionais, avaliamos o efeito da agmatina na proliferação celular e na diferenciação neuronal na zona subgranular (ZSG) do giro dentado (GD) do hipocampo, nas subregiões dorsal e ventral. O protocolo de administração crônica de corticosterona diminuiu a proliferação celular em todo o GD do hipocampo, resultado evidenciado pela diminuição de células Ki-67 e PCNA positivas, bem como nas subregiões ventral e dorsal (demonstrado apenas pelo marcador Ki-67). O tratamento com agmatina ou fluoxetina reverteu a diminuição da proliferação celular causada pela exposição dos animais à corticosterona. No entanto, o tratamento crônico com corticosterona não foi capaz de reduzir a diferenciação neuronal, quando avaliado o GD todo e as subregiões separadamente (demonstrado pelos marcadores de diferenciação NeuroD e DCX). Em contrapartida o tratamento com agmatina aumentou a diferenciação neuronal (demonstrado pelo marcador DCX) em todo GD e também nas subregiões ventral e dorsal do hipocampo, de forma semelhante ao

resultado observado com o antidepressivo clássico fluoxetina (demonstrado pelo marcador NeuroD e DCX). Além de aumentar o número de neurônios imaturos (células DCX positivas), a agmatina foi capaz de aumentar a complexidade dendrítica tanto na arborização dendrítica quanto no comprimento dos dendritos de todo o GD hipocampal, sendo este efeito mais evidente na porção ventral. Em conjunto, os resultados indicam que a agmatina possui propriedades pró-neurogênicas, sugerindo que esta pode se constituir em uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da depressão associada ao estresse.

Palavras chave: agmatina, depressão, proliferação celular, diferenciação neuronal, neurogênese, complexidade dendrítica.

ABSTRACT

Adult neurogenesis has been shown to be reduced in depressive patients, and the behavioral responses to antidepressant drugs are dependent on the neurogenesis. Agmatine is an endogenous amine that elicits antidepressant effects when administered to rodents and humans. The present study investigated the antidepressant-like effect of chronic treatment with agmatine in an animal model of stress induced by chronic administration of corticosterone to mice, as well as its effects on cellular proliferation, neuronal differentiation and dendritic complexity in the hippocampus. Chronic administration of corticosterone (20 mg/kg, p.o., 21 days) increased the immobility time in the tail suspension test (TST), an effect reversed by co-administration with agmatine (0.1 mg/kg, p.o., 21 days) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o., 21 days –positive control), but did not cause anhedonic behavior in the splash test. Considering the relationship between depression and anxiety, the anxiety-related behavior of mice was also evaluated in the open-field test. Corticosterone administration did not alter the anxiety-related parameters in mice, but agmatine treatment was able to increase the number of entries in the center of the open field, an indicative of anxiolytic-like effect. Taking into account the available evidence in literature on the increased neurogenesis following chronic administration of conventional antidepressants, this study also investigated the effects of agmatine on hippocampal cell proliferation and neuronal differentiation in the ventral and dorsal subregions of the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus. Corticosterone administration caused decreased hippocampal cell proliferation in the whole dentate gyrus as shown by the decreased number of Ki-67 and PCNA positive cells, as well as in the ventral and dorsal aspects of the hippocampus (as shown by Ki-67 staining). Treatments with agmatine or fluoxetine were able to reverse these corticosterone-induced alterations on cellular proliferation parameters. Regarding neuronal differentiation, the results show that it was not affected by corticosterone administration, as assessed by NeuroD and DCX staining in the dentate gyrus of the hippocampus. Fluoxetine was able to increase hippocampal differentiation measured by NeuroD and DCX positive cells. However, agmatine treatment only enhanced DCX positive cells, when evaluated the whole hippocampus and the individually dorsal and ventral subregions. Besides increasing DCX

positive cells, agmatine was capable of enhancing dendritic complexity, since it enhanced both the dendritic length and arborization in the dentate gyrus of the hippocampus, mainly in the ventral aspect of this region. Altogether, our results suggest that agmatine exhibits pro-neurogenic property, suggesting that it may constitute a novel therapeutic strategy for the management of depression associated with stress.

Keywords: agmatine, depression, cellular proliferation, neuronal differentiation, neurogenesis, dendritic complexity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT_{1A}- Receptor de serotonina do subtipo 1A
5-HT_{2A} - Receptor de serotonina do subtipo 2A
5-HT₃ - Receptor de serotonina do subtipo 3
ACTH- Hormônio Adrenocorticotrófico
BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
BHE- Barreira Hematoencefálica
CRH- Hormônio Liberador de Corticotrofina
DCX- Doublecortina
DAB- 3,3'-diaminobenzidina
DSM-V- Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais 5
GD- Giro denteado
GR- Receptores Glicocorticóides
HPA- Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
i.c.v – intracerebroventricular
i.p. –intraperitoneal
I.S.R.S- Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LTP- Potenciação de Longa Duração
MR- Receptores Mineralocorticóides
NMDA- N-metil-D-aspartato
NO- Óxido Nítrico
NOS- Óxido Nítrico Sintase
P.A.- Pureza Analítica
p.o- *per oral* (via oral)
PFA- Paraformaldeído
PBS- *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato)
PI-3K - Fosfatidilinositol 3'-cinase
PKA - Proteína cinase A
PKB - Proteína cinase B
ZSV- Zona subventricular
ZSG- Zona subgranular
s.c. – subcutânea
SNC – Sistema Nervoso Central
TBS- Teste de borrifagem de sacarose
TCA- Teste do Campo Aberto
TDM- Transtorno Depressivo Maior
TNF- Teste do Nado Forçado
TrkB - Tropomiosina cinase B
TSC- Teste de Suspensão pela Cauda

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1- Tabela 1- Sintomas para diagnóstico da depressão - DSM-V.....18

Quadro 1- Diferentes estudos utilizando modelo de administração crônica de corticosterona e as alterações observadas na neuroplasticidade hipocampal.....33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Resposta ao estresse pela ativação do eixo HPA	22
Figura 2- Hipótese neurotrófica da depressão	25
Figura 3- Estágios da Neurogênese	29
Figura 4 - Síntese e degradação da agmatina	39
Figura 5- Procedimentos experimentais realizados.....	48
Figura 6- Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina e fluoxetina no TSC e TCA.....	56
Figura 7- Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina e fluoxetina no TBS	58
Figura 8- Avaliação do efeito tipo-ansiolítico da agmatina e fluoxetina no TCA	60
Figura 9- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a expressão de células Ki-67- positivas	62
Figura 10- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a expressão de células PCNA - positivas	63
Figura 11- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a expressão de células NeuroD - positivas.....	66
Figura 12- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a expressão de células DCX - positivas.....	67
Figura 13 - Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a complexidade dendrítica.....	69
Figura 14- Resumo dos resultados	701

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 DEPRESSÃO.....	17
1.2 NEUROGÊNESE	26
1.3 AGMATINA: VISÃO GERAL E SEUS PRINCIPAIS EFEITOS NO SNC	39
1.4 AGMATINA E DEPRESSÃO	42
2 JUSTIFICATIVA	44
3 HIPÓTESE	45
4 OBJETIVOS	45
4.1 OBJETIVO GERAL	45
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
5 MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1 ANIMAIS	47
5.2 FÁRMACOS E TRATAMENTOS.....	47
5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	49
5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	50
5.5 ANÁLISE DE SHOLL.....	52
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6 RESULTADOS	55
6.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGMATINA E FLUOXETINA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA	55
6.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGMATINA E FLUOXETINA EM ANIMAIS EXPOSTOS A ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA NO COMPORTAMENTO ANEDÔNICO	57
6.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGMATINA E FLUOXETINA EM ANIMAIS EXPOSTOS A ADMINISTRAÇÃO	

CRÔNICA DE CORTICOSTERONA NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO	59
6.4 EFEITOS DA CORTICOSTERONA, AGMATINA E FLUOXETINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO	61
6.5 EFEITOS DA CORTICOSTERONA, AGMATINA E FLUOXETINA NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO	64
6.6 EFEITOS DA CORTICOSTERONA, AGMATINA E FLUOXETINA NO COMPRIMENTO E ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA DE NEURÔNIOS IMATUROS NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO	68
7 DISCUSSÃO	73
8 CONCLUSÃO	83
PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

A depressão (transtorno depressivo maior) é um transtorno psiquiátrico de alta prevalência, atualmente 350 milhões de pessoas são acometidas em todo o mundo. Em média, 1 em 20 pessoas relatam ter passado por um episódio de depressão anualmente. Por iniciar em uma idade jovem, os transtornos depressivos levam à perda de produtividade nos estudos ou no trabalho, além de prejuízo nas relações interpessoais, o que leva a um aumento da utilização dos serviços de saúde e acarreta em altos custos para os cofres públicos. Se a depressão não for tratada adequadamente, pode evoluir para episódios de longa duração com intensidade moderada ou grave, tornando-se uma condição crítica de saúde. Em última instância a depressão pode levar ao suicídio. No mundo, mais de 800 mil pessoas cometem suicídio a cada ano, sendo que é a segunda principal causa de morte na faixa etária entre os 15 e 29 anos de idade. Em 2030, estima-se que a depressão poderá ser o principal transtorno responsável por morte prematura e pela diminuição da saúde (CUIPERS e SMIT, 2002; LEPINE e BRILEY, 2011; BAXTER *et al.*, 2013; FERRARI *et al.*, 2013).

Na América do Sul a prevalência de depressão é de 16,5% (BAXTER *et al.*, 2013). No Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde realizada pelo Instituto de Geografia e Estatística (IBGE, 2013) estimou que 7,6% das pessoas de 18 anos ou mais de idade receberam diagnóstico de depressão, o que representa 11,2 milhões de pessoas, sendo que esta prevalência é maior nas áreas urbanas (8%) do que rurais (5,6%). Na região sul do país este percentual apresentou-se ainda mais elevado do que o nacional, sendo de 12,6%. Segundo estes dados, as mulheres são mais afetadas pela depressão do que os homens (10,9%, 3,9%, respectivamente). Neste estudo, aproximadamente metade dos homens (51,2%) e mulheres (52,3%) que já possuíam diagnóstico de depressão faziam o uso de medicamentos antidepressivos (IBGE, 2013). De modo geral o Brasil parece apresentar uma prevalência similar a encontrada no mundo, com exceção da região Sul onde essa prevalência é aumentada (MUNHOZ *et al.*, 2016).

A variabilidade de sintomas reflete as várias regiões cerebrais que estão envolvidas no desenvolvimento da depressão. Mais especificamente, estudos *post mortem* (DREVETS, 2001; HARRISON,

2002) e de neuroimagem (DREVETS, 2001; SHELINE, 2003) demonstram redução do volume de massa cinzenta e da densidade glial no hipocampo e córtex pré-frontal de pacientes com depressão, o que pode explicar os prejuízos cognitivos apresentados por estes. Além disso, estudos de ressonância magnética funcional e tomografia por emissão de pósitrons demonstram o envolvimento da amígdala e do córtex cingulado (uma subregião do córtex pré-frontal) nos sintomas disfóricos apresentados por pessoas acometidas com este transtorno, uma vez que a ativação destas regiões é aumentada em situações de sentimentos como a tristeza, por exemplo (FURMARK *et al.*, 2002; RESSLER e MAYBERG, 2007). Este caráter heterogêneo da doença explica, pelo menos em parte, a gama de alterações comportamentais características deste transtorno (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

Para o diagnóstico da depressão o V Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V, 2013) estabelece que cinco ou mais dos sintomas citados a seguir (**Tabela 1**) devem estar presentes durante o mesmo período de duas semanas, sendo que pelo menos um dos sintomas deve ser (1) humor deprimido ou (2) perda de interesse ou prazer. Deve-se considerar também que os sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo, além disso o episódio não deve ser atribuível aos efeitos fisiológicos de uma substância ou a outra condição médica.

Tabela 1- Sintomas para diagnóstico da depressão - DSM-V

- 1) Humor deprimido na maior parte do dia
 - 2) Acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades
 - 3) Perda ou ganho significativo de peso sem estar fazendo dieta (p. ex., uma alteração de mais de 5% do peso corporal em um mês)
 - 4) Insônia ou hipersonia quase todos os dias
 - 5) Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias
 - 6) Fadiga ou perda de energia quase todos os dias.
 - 7) Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada
 - 8) Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, ou indecisão, quase todos os dias
 - 9) Pensamentos recorrentes de morte (não somente medo de morrer), ideiação suicida recorrente sem um plano específico, uma tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.
-

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais, 5ed

(DSM-V, 2013).

Embora tenham sido descritas diversas alterações neurobiológicas correlacionadas aos sintomas depressivos, a etiologia deste transtorno ainda não está bem estabelecida. A primeira hipótese que explicou as bases neurobiológicas da depressão surgiu na década de 1950, e foi embasada no fato de que pacientes que faziam o uso de reserpina para o tratamento de hipertensão começaram a apresentar sintomas de depressão. Mais tarde foi constatado que este fármaco reduz drasticamente os níveis de monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina) na fenda sináptica, uma vez que apresentava como mecanismo de ação o bloqueio do transportador vesicular de monoaminas (FREIS, 1954; NEMEROFF, 1998). Além deste fato, foi observado que pacientes que faziam uso de iproniazida para o tratamento de tuberculose apresentaram exaltação do humor, aumento da energia e de sensibilidade a estímulos, indicando efeitos psicoestimulantes. Este fármaco apresenta como mecanismo de ação a potente inibição monoamina oxidase (MAO), levando ao acúmulo de serotonina no sistema nervoso central (SNC), o que explica os sintomas demonstrados pelos pacientes (DEVERTEUIL e LEHMANN, 1958).

Somando as evidências farmacológicas de que drogas capazes de depletar as monoaminas levam a sedação e depressão e que fármacos que aumentam os níveis destes neurotransmissores levam a excitação e diminuição dos sintomas em pacientes depressivos, consolidou-se então a hipótese catecolaminérgica da depressão. Esta hipótese postula que os sintomas depressivos estão relacionados a uma redução do conteúdo de monoaminas na fenda sináptica (SCHILDKRAUT, 1965).

Baseado nesta teoria e reforçando o envolvimento das monoaminas na fisiopatologia da depressão, fármacos capazes de aumentar os níveis de monoaminas na fenda sináptica, por impedir sua recaptação ou sua degradação enzimática, têm sido atualmente utilizados como terapia (PRINS, OLIVIER e KORTE, 2011). As classes de antidepressivos disponíveis para utilização clínica no tratamento da depressão são, os inibidores da MAO, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e de noradrenalina (ISRN) ou de recaptação dual (serotonina/noradrenalina), além de antidepressivos tricíclicos e atípicos (MORILAK e FRAZER, 2004).

Os fármacos antidepressivos convencionais proporcionam um início da remissão dos sintomas que pode demorar de 3 a 5 semanas, o que sugere que o aumento nos níveis de monoaminas não é o único fator responsável pelo resultado terapêutico observado na clínica, uma vez

que o efeito farmacológico no metabolismo das monoaminas é essencialmente imediato (NESTLER *et al.*, 2002).

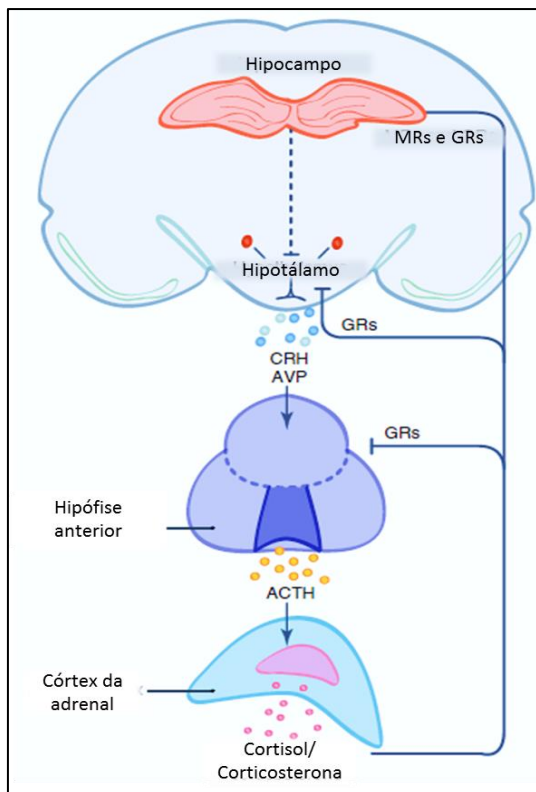
Desta forma, a hipótese monoaminérgica tem sido considerada simplista, pois não explica completamente o atraso na remissão dos sintomas depressivos, além disso, cerca de 50% dos pacientes não respondem a este tipo de tratamento (BERTON e NESTLER, 2006). Existem outros eventos que procuram explicar este fato, como o excesso de serotonina no espaço extracelular no núcleo da rafe, que leva a uma ativação de autoreceptores 5-HT_{1A} em neurônios serotoninérgicos após o tratamento com antidepressivos, com a consequente redução da liberação de serotonina. A administração crônica (14 – 28 dias) destes fármacos, principalmente ISRS, leva a dessensibilização dos autoreceptores, resultando no aumento da liberação de serotonina no córtex pré-frontal. Esse mecanismo de dessensibilização é sugerido como explicação para o longo tempo da remissão dos sintomas nos pacientes (ARTIGAS *et al.*, 1996). Além disso tais como as alterações neurotróficas, a sinalização intracelular, a funcionalidade e a plasticidade sináptica, incluindo a neurogênese e a sinaptogênese e o remodelamento dos circuitos neuronais. Estes importantes fatores estão envolvidos na fisiopatologia da depressão e vêm sendo alvo de estudos para aprimoramento das alternativas de tratamento deste transtorno (DUMAN e VOLETI, 2012; MUSAZZI *et al.*, 2013).

A causa da depressão não está definida, porém já se sabe que é de ordem multifatorial, podendo ser resultado da influência de doenças sistêmicas, de fatores genéticos ou ambientais. Dentre os fatores ambientais destaca-se o estresse (KRISHNAN e NESTLER, 2008). O estresse tem sido o fator etiológico mais discutido nos dias atuais, uma vez que estamos expostos continuamente a eventos estressantes. O estresse pode ser benéfico ou prejudicial dependendo da intensidade e duração, bem como das características biopsicossociais, pois estas estão relacionadas à capacidade do indivíduo de reagir às alterações de humor, possíveis fatores etiológicos para que sejam desencadeados transtornos de ansiedade e transtorno depressivo. Os efeitos prejudiciais do estresse ocorrem devido a resposta fisiológica ao estresse, que se dá através da estimulação excessiva do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (SAPOLSKY, 2015).

1.1.1 Depressão e a ativação do eixo HPA

A sinalização do eixo HPA é mediada pela liberação de corticoides (cortisol em humanos ou corticosterona em roedores) pelo córtex da glândula adrenal. Esta etapa se constitui no produto final do eixo que compreende o hipotálamo, a glândula hipófise e a adrenal. As células do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no sistema circulatório da glândula hipófise, que por sua vez libera da sua porção anterior o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea, que promove a liberação de corticoides pela adrenal (SCHLOESSER, MARTINOWICH e MANJI, 2012) (**Figura 1**).

Os efeitos do cortisol ou corticosterona são mediados por receptores mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR). Os corticoides exibem alta afinidade pelos receptores MR, consequentemente sua ativação se dá diante de níveis basais deste hormônio, em contrapartida apresentam baixa afinidade pelos receptores GR, estes são ativados somente em condições de estresse quando os níveis de glicocorticóides estão muito elevados (DE KLOET, JOELS e HOLLSBOER, 2005). O hipocampo possui uma grande concentração de receptores GR assim, pode regular negativamente o eixo HPA, por inibir a liberação do CRH pelo núcleo paraventricular do hipotálamo mantendo a homeostase do eixo. O desequilíbrio crônico deste eixo em resposta às situações de estresse, pode resultar no prejuízo do funcionamento deste *feedback negativo* exercido pelo hipocampo via receptores GR (**Figura 1**) (ANACKER *et al.*, 2011).

Figura 1- Resposta ao estresse pela ativação do eixo HPA

Legenda: A ativação do eixo HPA leva a produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de arginina-vasopresina (AVP) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo. Estes hormônios liberados na corrente sanguínea levam a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise anterior. ACTH estimula a síntese e liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos, corticosterona em roedores) do córtex adrenal para a corrente sanguínea. Os efeitos celulares dos glicocorticóides são mediados via receptores de glicocorticóides (GRs) e receptores de mineralocorticóides (MRs). O controle regulatório sobre o eixo HPA é mediado por feedback negativo a nível da glândula hipófise, bem como de outras regiões do cérebro, incluindo o hipocampo. Adaptado de Schloesser, Martinowich e Manji (2012).

Embora ainda seja aceito que o papel fisiológico da resposta ao estresse é coordenar respostas autonômicas, neuroendócrinas e imunes a potenciais ameaças homeostáticas, um conceito emergente na neurobiologia do estresse sugere que o seu principal papel é mobilizar energia prioritariamente para promover a sobrevivência mediante um evento. Partindo desse princípio, as respostas ao estresse agudo e crônico são consideradas adaptativas, até certo ponto, e preparam o organismo para as situações atuais e futuras (DALLMAN *et al.*, 2006).

Consideráveis evidências reforçam a ideia de que a exposição ao estresse favorece o desenvolvimento de transtornos de humor como a depressão. A exposição prolongada a altos níveis de glicocorticóides acarreta na redução da resiliência celular, tornando os neurônios mais vulneráveis a insultos como estresse oxidativo e excitotoxicidade (HUNSBERGER *et al.*, 2009; GIGANTE *et al.*, 2011). Consequentemente ocorre a redução da transmissão sináptica, atrofia e diminuição de espinhos dendríticos, culminando no prejuízo das funções cognitivas (MUSAZZI, TRECCANI e POPOLI, 2015). Neste sentido, estudos em cérebros *post mortem* de pacientes com depressão e/ou ansiedade demonstram atrofia ou diminuição dos neurônios principalmente do córtex pré-frontal e no hipocampo em paralelo com alterações no eixo HPA (SHELIN *et al.*, 1996; SHAH *et al.*, 1998; SAPOLSKY, 2000; WATSON *et al.*, 2004).

Essa condição observada em pacientes tem sido também observada em animais experimentais. Estudos não clínicos já demonstraram que os comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso dos camundongos estão relacionados ao aumento dos níveis séricos de corticosterona (CHEN *et al.*, 2015; SALARI, BAKHTIARI e HOMBERG, 2015). Além disso, tem-se mimetizado esta alteração através de intervenção farmacológica, como por exemplo, a administração crônica de corticosterona. Pesquisas tem demonstrado que a exposição crônica a corticosterona promove um comportamento tipo-depressivo nos animais em testes preditivos para depressão, como o teste de suspensão pela cauda (TSC) e o teste do nado forçado (TNF), que pode também ser associado a um comportamento anedônico evidenciado pela diminuição do consumo de sacarose (ROSA *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2016; PAZINI *et al.*, 2016a; WENG *et al.*, 2016).

Os mecanismos pelo qual a exposição crônica a corticosterona induz um comportamento tipo-depressivo não são completamente compreendidos, entretanto tem sido postulado que uma diminuição de

fatores tróficos, assim como comprometimento na neurogênese e plasticidade hipocampal desempenham um papel central neste efeito (SAALTINK e VREUGDENHIL, 2014; MILLER e HEN, 2015).

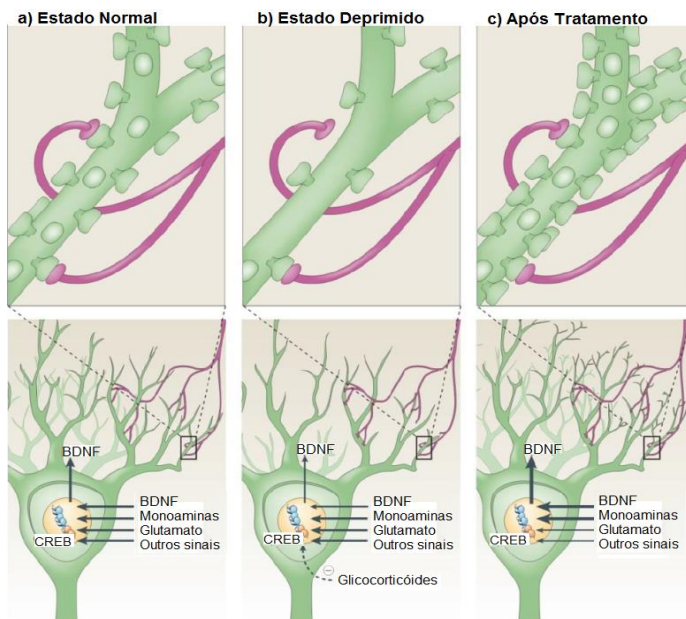
1.1.2 Hipótese Neurotrófica da Depressão

A hipótese neurotrófica da depressão é baseada em observações de alterações morfológicas em pacientes com depressão, como atrofia e diminuição da plasticidade em córtex cerebral e hipocampo (SAPOLSKY, 2000; SHELINE, 2003) somada a falta de subsídios para sustentar a hipótese monoaminérgica da depressão. Esta hipótese postula que o estado depressivo está relacionado com uma redução da neuroplasticidade em decorrência da redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Esta hipótese é apoiada em evidências de que pacientes com depressão de fato apresentam diminuição do volume hipocampal e da região límbica bem como do córtex cerebral, associada a um decréscimo dos fatores tróficos que regulam a plasticidade no cérebro adulto (MONTEGGIA *et al.*, 2004; DUMAN e MONTEGGIA, 2006).

Grande parte dos estudos tem se concentrado principalmente no papel do BDNF, por ser este amplamente expresso nas estruturas límbicas do cérebro adulto. O polimorfismo de BDNF (substituição de valina por metionina na posição 66) está presente em aproximadamente 25% da população. Esta alteração acarreta em prejuízos na liberação do BDNF e está associado ao aumento da susceptibilidade à depressão (EGAN *et al.*, 2003; SEN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004; GATT *et al.*, 2009; ZHANG, L. *et al.*, 2016). Corroborando com esta hipótese, o trabalho de Chen e colaboradores (2001), analisou tecidos *post mortem* de pacientes depressivos tratados com antidepressivos clássicos, encontrando um aumento no BDNF hipocampal, quando comparados com pacientes não tratados (CHEN *et al.*, 2001).

As evidências acerca do papel do BDNF nos transtornos de humor são suportadas por estudos não clínicos que mostram que diferentes formas de estresse reduzem a sinalização de BDNF no hipocampo, enquanto que o tratamento crônico com antidepressivos melhora este déficit (**Figura 2**) (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; CASTREN e RANTAMAKI, 2010).

Figura 2- Hipótese neurotrófica da depressão



Legenda: a) Neurônio piramidal hipocampal em estado normal. b) O aumento de glicocorticóides devido ao estresse crônico causa alterações nestes neurônios, reduzindo a expressão de BDNF e consequentemente a sua arborização dendrítica bem como os espinhos dendríticos. c) Os antidepressivos reverterem os efeitos deletérios produzidos pelo estresse e excesso de glicocorticóides, aumentando a expressão de BDNF, a arborização dendrítica e os contatos sinápticos. Adaptado de Berton e Nestler (2006).

Além disso, o BDNF parece ser uma molécula chave para o efeito tipo-antidepressivo, pois já foi observado em animais que uma única infusão direta de BDNF no hipocampo é capaz de produzir um efeito antidepressivo similar ao obtido com a administração crônica de fármacos antidepressivos (SHIRAYAMA *et al.*, 2002). Já foi demonstrado que animais que apresentam o polimorfismo geneticamente introduzido na posição 66 na molécula de BDNF (troca de valina por metionina) apresentam prejuízos na transmissão sináptica e na plasticidade do córtex pré-frontal medial infralímbico, reforçando o

envolvimento do BDNF nos transtornos de humor e nos prejuízos cognitivos (PATTWELL *et al.*, 2012). Nestes animais mutados, os níveis de BDNF hipocampal é muito reduzido, além de apresentarem uma sobrevivência celular diminuída que não é revertida com o tratamento com fluoxetina, diferente dos animais selvagens nos quais a fluoxetina aumenta a taxa de sobrevivência celular. Isto confirma a importância da participação desta neurotrofina no efeito dos antidepressivos convencionais (BATH *et al.*, 2012).

Há algum tempo vem se postulando que a neurogênese parece ser o processo chave para ação dos antidepressivos, sendo esta alteração morfológica produzida pelos fármacos dependente de BDNF (NIBUYA, MORINOBU e DUMAN, 1995; MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003).

1.2 NEUROGÊNESE

A neurogênese, processo de produção de novos neurônios a partir de células tronco neurais, ocorre durante o desenvolvimento e o período pós-natal, e com menor intensidade durante a vida adulta (APPLE, FONSECA e KOKOVAY, 2017). O primeiro relato da literatura sobre neurogênese adulta foi publicado em 1965, este fato foi evidenciado injetando sistemicamente em ratos timidina tritiada, que é um precursor específico de DNA cromossômico e é incorporada nos núcleos celulares somente quando o novo DNA é formado em células que estão em multiplicação (ALTMAN e DAS, 1962).

Antes deste relato acreditava-se que a capacidade de geração de novos neurônios estava restrita apenas ao período de desenvolvimento e período perinatal e a quebra deste paradigma existente até então foi encarada com ceticismo durante três décadas. Apesar de alguns estudos terem posteriormente demonstrado também a proliferação celular no cérebro de roedores, esses não suportavam a ideia de que este evento poderia ocorrer no cérebro humano (CAMERON *et al.*, 1993). Então, observou-se que este evento de proliferação celular no cérebro de animais poderia ser influenciado por alguns fatores. Logo, verificou-se que o enriquecimento ambiental aumentava a proliferação no GD de ratos (KEMPERMANN, KUHN e GAGE, 1997). Por outro lado, foi observado em musaranhos (*Tupaia belangeri*), que a exposição ao estresse agudo regulava negativamente a proliferação celular no giro

denteado (GD) do hipocampo, porém o bloqueio de receptores de glutamato do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) regulava positivamente a proliferação (GOULD *et al.*, 1997). Ainda foi demonstrado que macacos (*Callithrix jacchus*) submetidos a um protocolo de estresse, no qual eram expostos a um residente intruso, apresentava proliferação celular hipocampal reduzida em relação aos animais não estressados (GOULD *et al.*, 1998).

Entretanto, somente com a publicação de um estudo *post mortem* foi demonstrado pela primeira vez que existe proliferação celular no cérebro humano. Neste estudo os pacientes receberam uma injeção com um análogo da timidina bromodeoxiuridina (BrDU), e após o óbito destes, foi possível realizar processamento do tecido cerebral e verificar que novas células estavam proliferando e se diferenciando em neurônios nos encéfalos de humanos adultos. Ainda neste estudo foram identificadas as regiões específicas onde era observado este fenômeno (ERIKSSON *et al.*, 1998).

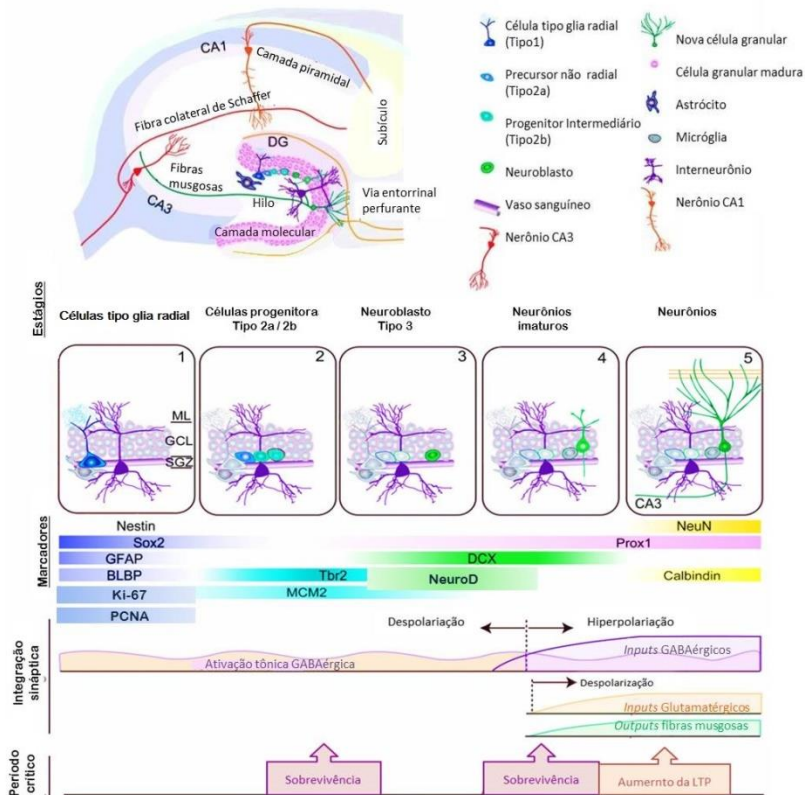
Atualmente é bem aceito e estabelecido que existe a formação de novos neurônios limitada a algumas regiões do cérebro de roedores e humanos adultos, estas regiões são a zona subgranular (ZSG) no GD do hipocampo, e a zona subventricular (ZSV) no ventrículo lateral (KEMPERMANN e GAGE, 2000; ALVAREZ-BUYLLA e GARCIA-VERDUGO, 2002). Esses novos neurônios formados possuem a capacidade de se integrar na circuitaria cerebral e apresentam funções fisiológicas de extrema importância, estando implicados no aprendizado, na memória, no medo condicionado, na plasticidade sináptica e na modulação das emoções (VAN PRAAG *et al.*, 2002; BRAUN e JESSBERGER, 2014). A neurogênese adulta é um processo dinâmico, porém não imediato, leva de 4 até 6 semanas para ser completado, e pode ser influenciado em algumas condições fisiológicas, patológicas e farmacológicas. Compreende quatro estágios: 1) Manutenção e proliferação de células tronco neurais progenitoras (quiescentes), 2) Especificação do destino celular 3) Diferenciação, maturação e sobrevivência dos neurônios imaturos, 4) Integração no circuito cerebral existente (GONCALVES, SCHAFER e GAGE, 2016).

A ZSG no GD do hipocampo contém um nicho de células tronco, e estas células possuem duas características definidas: a capacidade de auto-renovação através da etapa de divisão celular e a capacidade de gerar células especializadas através da etapa de diferenciação. Tanto no cérebro de roedores quanto em humanos, estas células podem se diferenciar em neurônios ou glia, conceito este que

tem sido formado a partir de estudos *in vitro*. Além da população de células progenitoras neurais, esta área contém uma densa rede vascular que está estreitamente associada ao nicho celular e acredita-se que desempenhe papel importante no suporte da neurogênese (REYNOLDS e WEISS, 1992; KUKKOV *et al.*, 1999; PALMER *et al.*, 1999; ROY *et al.*, 2000).

Antes de se integrar funcionalmente na circuitaria neuronal do hipocampo estas células passam por alguns estágios de desenvolvimento, além de apresentarem algumas características diferentes das células maduras. As células do tipo 1, também denominadas células tipo glia radial são encontradas no nicho de células tronco e podem dar origem a células que irão manter a taxa celular de auto-renovação (células tipo 2a) e a progenitores intermediários (células do tipo 2b) que apresentam características transitórias de amplificação. Ocorre então uma transição da fase mitótica para a fase pós-mitótica, onde essas células do tipo 2b podem dar origem a neuroblastos (células do tipo 3), que subsequentemente darão origem a neurônios maduros (**Figura 3**) (GONCALVES, SCHAFER e GAGE, 2016).

Figura 3- Estágios da Neurogênese



Legenda: Demonstração dos cinco estágios de desenvolvimento durante a neurogênese do hipocampo adulto: (1) Ativação de células de tipo glia radial quiescente na zona subgranular (ZSG); (2) proliferação de precusores não radiais (Tipo2a) e progenitores intermediários (Tipo2b); (3) geração de neuroblastos (células Tipo3); (4) integração de neurônios imaturos; (5) maturação de células de grânulos dentados adultos. Na parte superior da figura está demonstrado a integração sináptica dentro do hipocampo, bem como as projeções destes novos neurônios para região CA3, que posteriormente apresenta contatos sinápticos com a região CA1. Na parte inferior está demonstrado a expressão de marcadores específicos de cada estágio, o processo sequencial de integração sináptica e os períodos críticos que regem a sobrevivência e a plasticidade. ML: camada molecular; GCL: camada granular; ZSG: zona

subgranular; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; BLBP: proteína de ligação lipídica do cérebro; Ki-67: Fator de proliferação celular ;PCNA: Antígeno Nuclear da Proliferação Celular; DCX: doublecortina; NeuroD: Fator de diferenciação Neurogênico; NeuN: núcleos neuronais; LTP: potenciação de longa duração. Adaptado de Ming e Song, 2011.

Durante estas fases além das mudanças morfológicas, ocorre também transições na expressão de proteínas e fatores gênicos. As células do tipo 2b que estão em constante processo mitótico expressam em seu núcleo a proteína Ki-67 (KEE *et al.*, 2002). Outra proteína expressa durante a divisão celular é o antígeno nuclear celular (PCNA), esta é uma proteína auxiliar da DNA polimerase, expressa durante a divisão celular principalmente nas fases G1 e S e está diminuído na fase G2 (KURKI *et al.*, 1986; GALAND e DEGRAEF, 1989). Quando diferenciadas em células do tipo 3, expressam o fator de diferenciação neurogênico NeuroD precocemente até o momento em que se inicia a formação de novos dendritos (SEKI, 2002). Posteriormente quando já estão em processo de migração e arborização dendrítica, estas células expressam a proteína associada aos microtúbulos doublecortina (DCX) (FRANCIS *et al.*, 1999; GLEESON *et al.*, 1999). O acompanhamento das expressões de alguns destes marcadores endógenos moleculares ao longo dos estágios da neurogênese permitem o monitoramento destes estágios através de técnicas como a imunohistoquímica (ABROUS, KOEHL e LE MOAL, 2005).

Dois períodos são críticos para a sobrevivência destas células, um é o estágio de transição progenitor intermediário e neuroblasto e outro é entre período em que o neurônio ainda é imaturo e a sua integração sináptica (TASHIRO *et al.*, 2006; MOURET *et al.*, 2008). Os novos neurônios formados sofrem um processo estereotípico para a integração sináptica nos circuitos, são inicialmente ativados tonicamente pelo GABA liberado a partir de interneurônios locais posteriormente recebem *inputs* sinápticos GABAérgicos e, finalmente, *inputs* sinápticos glutamatérgicos (ESPOSITO *et al.*, 2005; GE *et al.*, 2006; BHATTACHARYYA *et al.*, 2008). Estes *inputs* glutamatérgicos recebidos são essenciais para aumentar a plasticidade sináptica e promover a sobrevivência deste neurônio após a integração sináptica, tanto que também é considerada uma fase crítica para a sobrevivência dos novos neurônios (TASHIRO *et al.*, 2006; GE *et al.*, 2007). Os neurônios imaturos migram na camada granular e se diferenciam em células granulares no hipocampo. Em alguns dias esses novos neurônios

estendem os dendritos pela camada molecular e projetam os axônios através do hilo para a região CA3 do hipocampo, estas por sua vez enviam fibras de Schaffer para comunicar-se com a região CA1 (**Figura 3**) (ZHAO *et al.*, 2006).

O gatilho que estimula a neurogênese pode ter origem diretamente endógena como neurotrofinas (por exemplo, BDNF), fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento vascular endotelial VEGF, fator de crescimento de fibroblasto-2, FGF-2) hormônios e citocinas (ZHAO, DENG e GAGE, 2008; KANG e HEBERT, 2015; WANG *et al.*, 2015). Alguns estímulos externos também já estão bem descritos por promover a neurogênese como fármacos antidepressivos (por exemplo a fluoxetina) (MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003), e também o exercício físico (THARMARATNAM *et al.*, 2017). Em contrapartida, alguns processos regulam negativamente este processo como por exemplo a liberação excessiva de glicocorticóides e o estresse crônico (CAMERON e GOULD, 1994; TANAPAT, GALEA e GOULD, 1998). Também já foi observado em pacientes com depressão prejuízos na neurogênese hipocampal adulta (DRANOVSKY e HEN, 2006; MILLER e HEN, 2015).

1.2.1 Estresse, depressão e neuroplasticidade

Como já mencionado, em situações de estresse ocorre o aumento da liberação de glicocorticóides, sendo que a exposição crônica ao estresse pode levar ao desenvolvimento do transtorno depressivo. Excesso de glicocorticóides (WOOLLEY, GOULD e MCEWEN, 1990) ou exposição ao estresse (WATANABE, GOULD e MCEWEN, 1992; MAGARINOS *et al.*, 1996) levam à atrofia e retração dos dendritos apicais das células piramidais do hipocampo, o que já foi demonstrado em hipocampo *post-mortem* em pacientes com depressão (STOCKMEIER *et al.*, 2004).

Historicamente, os corticosteroides foram um dos primeiros fatores a ser estudados por influenciar na neurogênese adulta. Foi demonstrado em ratos que a retirada bilateral da glândula adrenal aumenta a proliferação celular e a formação de novos neurônios e glia no GD do hipocampo, efeito que não é observado na zona subventricular, sugerindo a supressão da neurogênese específica no hipocampo pelos corticosteroides (GOULD *et al.*, 1992; MCEWEN *et*

al., 1993; RODRIGUEZ *et al.*, 1998; SPANSWICK, EPP e SUTHERLAND, 2011). Ainda, a administração de antagonistas de receptores de glicocorticóides é capaz de prevenir a redução da neurogênese hipocampal induzida pela administração crônica de corticosterona (MAYER *et al.*, 2006), corroborando o fato dos corticoides modularem negativamente este processo. Embora os mecanismos subjacentes a estes efeitos da corticosterona não sejam totalmente compreendidos, têm-se postulado que uma diminuição da neurogênese hipocampal desempenha um papel fundamental neste efeito (SAALTINK e VREUGDENHIL, 2014; MILLER e HEN, 2015).

Com base nestas evidências modelos animais de depressão envolvendo estresse crônico ganharam destaque, e possibilitaram ampliar os conhecimentos no que diz respeito a relação estresse e depressão. Um dos modelos que tem-se utilizado para mimetizar esta condição é o da administração crônica de corticosterona uma vez que apresenta validade preditiva, ou seja, apresentam respostas positivas a antidepressivos já utilizados na clínica (PAZINI *et al.*, 2016a; WENG *et al.*, 2016). Além disso, apresenta validade de face, ou seja, reproduz alguns sintomas apresentados por pacientes, como a anedonia ou o comportamento tipo-depressivo avaliado através de testes preditivos (FREITAS *et al.*, 2016; PAZINI *et al.*, 2016a). Ainda é possível observar que este modelo apresenta validade de constructo, uma vez que demonstra algumas alterações biológicas já observadas em pacientes com transtorno depressivo, como por exemplo a redução de BDNF e alterações em vias de sobrevivência celular (GONG *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2016).

Tendo em vista a convergência de mecanismos encontrados entre estresse, depressão e neuroplasticidade (PITTENGER e DUMAN, 2008) alguns grupos tem pesquisado os efeitos de modelos de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona sobre parâmetros de proliferação, diferenciação celular no hipocampo, além de alterações morfológicas dendríticas. No **Quadro 1** encontram-se compilados alguns trabalhos a respeito disso.

Quadro 1- Diferentes estudos utilizando modelo de administração crônica de corticosterona e as alterações observadas no comportamento e na neuroplasticidade hipocampal

Espécie/ Linhagem/ Sexo / Idade ou peso	Protocolo Dose/via de adm/ Período	Alterações Comportamentais	Proliferação celular: Marcador utilizado /efeito	Diferenciação neuronal: Marcador utilizado /efeito	Ref.
Camundongo C57BL/6J/ Macho 18-22g	40 mg/kg, s.c./35 dias	↑ Tempo de imobilidade no TNF e TSC ↓ Tempo de permanência e número de entradas no centro no TCA	↓ Células Ki- 67 ⁺ no GD hipocampo ventral e dorsal	↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo ventral e dorsal	(ZHANG, K. <i>et al.</i> , 2016b)
Camundongo Swiss/Fêmea/40–45 dias	20 mg/kg/ p.o/21 dias	↑ Tempo de imobilidade no TNF e TSC ↓ O consumo de sacarose no TCS	↓ Células Ki- 67 ⁺ no GD hipocampo ventral e dorsal	↓ Células NeuroD ⁺ no GD hipocampo ventral e dorsal	(PAZINI <i>et al.</i> , 2016a)

Camundongo C57BL/6J/ Macho 42-49 dias	40 mg/kg, s.c./56 dias	↑ Tempo de imobilidade no TNF e TSC ↓ Tempo de permanência e número de entradas no centro no TCA	↓ Células Ki-67 ⁺ no GD do hipocampo	↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo	(ZHANG, K. <i>et al.</i> , 2016a)
Camundongo C57BL/6Ntac/ Macho/ 56 dias	35 µg/ml/dia/ <i>ad libitum</i> na água de beber/ 20 semanas	↑ Tempo de imobilidade no TNF = não altera no TSC ↓ autolimpeza no TBS	↓ Células BrdU ⁺ no GD hipocampo	↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo	(SIOPI <i>et al.</i> , 2016)
Ratos, Sprague–Dawley/ Fêmea/ 77–84 dias	40 mg/kg/s.c. /21 dias e doses reduzidas entre 21 e 23 dias	↑ Tempo de imobilidade no TNF		Sem alterações no marcador DCX	(KOTT <i>et al.</i> , 2016)
Ratos, Sprague–Dawley/ Fêmea/ 77–84 dias	Pellet implantado contendo 200mg/21 dias	sem alterações no TNF		Sem alterações no marcador DCX	(KOTT <i>et al.</i> , 2016)

Ratos, Sprague–Dawley/ Fêmea/ 77–84 dias	200 µg/mL <i>ad libitum</i> na água de beber/21 dias e doses reduzidas entre 21 e 23 dias	sem alterações no TNF		↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo ventral	(KOTT <i>et al.</i> , 2016)
Camundongos com ablação genética de Bax com background de C57BL/6 e 129/SvEv/ Machos/56-70 dias	70 µg/mL <i>ad libitum</i> na água de beber/ 10 semanas	↑ Tempo de imobilidade no TSC ↓ Tempo de permanência nos braços abertos no LCE	Não altera Células BrdU ⁺ no GD hipocampo	↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo ventral	(HILL, SAHAY e HEN, 2015)
Ratos Long–Evans/Machos/200–250g	40 mg/kg/s.c./21 dias	↑ Tempo de imobilidade no TSC		↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo	(FENTON <i>et al.</i> , 2015)
Ratos Wistar/ Machos/±250g	Pellet implantado (200 mg/21 dias)			↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo ventral e dorsal	(DINIZ <i>et al.</i> , 2013)

Ratos Wistar/ Macho/56 dias	40 mg/kg/s.c./ 17 dias e 21 dias		↓ Células BrdU ⁺ no GD hipocampo ↓ Células PCNA ⁺ no GD hipocampo	↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo	(HU <i>et al.</i> , 2012)
Camundongos CD1/Machos/49-56 dias	35 µg/ml/dia/ <i>ad libitum</i> na água de beber/ 49 semanas	↓ Tempo de permanência no centro no TCA = sem alterações no TNF	↓ Células BrdU ⁺ no GD hipocampo	Sem alteração no marcador DCX	(CRUPI <i>et al.</i> , 2011)
Camundongos CD1/Machos/49-56 dias	35 µg/ml/dia/ <i>ad libitum</i> na água de beber/ 49 semanas	↓ Tempo de permanência no centro no TCA = sem alterações no TNF	↓ Células BrdU ⁺ no GD hipocampo	Sem alteração no marcador DCX	(CRUPI <i>et al.</i> , 2010)
Camundongos C57BL/6 X 129/Sv /Machos	0,5 mg/dia/s.c/28 dias	↓ Exploração social ↓ Preferência pela sacarose	↓ Células BrdU ⁺ no GD hipocampo	↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo	(GOSHEN <i>et al.</i> , 2008)

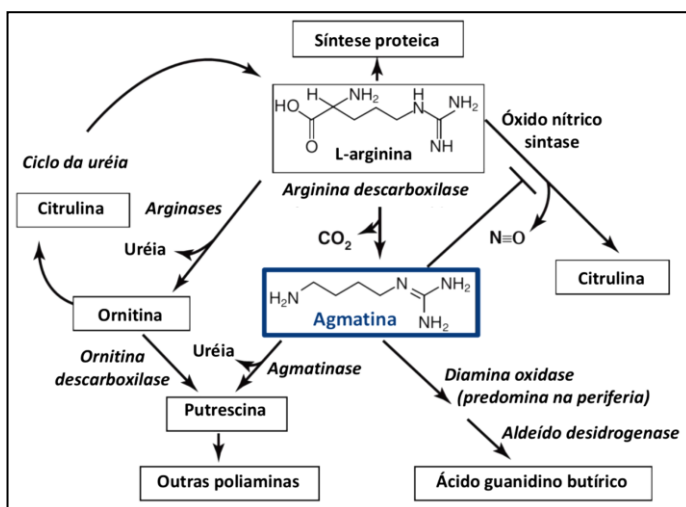
Ratos Wistar	10 mg/kg/s.c./21dias		↓ Células BrdU ⁺ no GD hipocampo	↓ Células DCX ⁺ no GD hipocampo	(MAYER <i>et al.</i> , 2006)
Ratos Sprague– Dawley/ Machos/84 dias	400 µg/ml/dia/ <i>ad libitum</i> na água de beber/ 21 dias		Sem alteração no marcador Ki-67	Sem alteração no marcador DCX	(NACHER, GOMEZ- CLIMENT e MCEWEN, 2004)
Ratos Wistar/ Machos/180g	40 mg/kg/s.c./21 dias		↓ Células BrdU ⁺ no GD hipocampo		(HELLSTEN <i>et al.</i> , 2002)

Legenda: a.d.m.= administração, s.c= subcutâneo, i.p.=intraperitoneal, p.o= *per oral* (via oral), g=gramas, TCA= Teste Campo Aberto, TSC= Teste de Suspensão pela Cauda, TNF= Teste do nado Forçado, TCS= Teste de Consumo de Sacarose, TBS= Teste de Borrifagem de Sacarose, LCE= Labirinto em Cruz Elevado, GD=giro denteado, Bax= gene que codifica proteína pró-apoptótica. Quadros em branco indicam análise não realizada no estudo. Trabalhos pesquisados na base de dados PUBMED pelos termos: *chronic administration corticosterone + neurogenesis*, foram inclusos trabalhos dos últimos 15 anos.

1.3 AGMATINA: Visão geral e seus principais efeitos no SNC

A agmatina é uma amina catiônica descoberta em 1994 em mamíferos e também encontrada em plantas, bactérias e invertebrados. É um produto intermediário no metabolismo de monoaminas e sua síntese ocorre no encéfalo e em outros tecidos e se dá por reações de descarboxilação da L-arginina catalisada pela enzima arginina descarboxilase (ADC). Após sua síntese, a agmatina pode ser metabolizada a putrescina durante a biossíntese de poliaminas, por ação da enzima agmatinase ou metabolizada a ácido guanidino butírico, por ação da enzima diamina oxidase (**Figura 4**) (REIS e REGUNATHAN, 2000b; RAASCH *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2003; MOINARD, CYNOBER e DE BANDT, 2005).

Figura 4 - Síntese e degradação da agmatina



Legenda: A agmatina é sintetizada a partir da L-arginina pela ação da enzima arginina descarboxilase (ADC). Durante a biossíntese de poliaminas a agmatina pode ser metabolizada a putrescina pela agmatinase ou pela diamina oxidase a produtos como espermina (não mostrado) ou ácido guanidino-butanóico, respectivamente. Além de precursora da agmatina, a L-arginina pode ser direcionada ao ciclo da uréia pela ação das arginases ou ainda a produção de citrulina pela ação

da óxido nítrico sintase, a qual pode ser inibida pela agmatina impedindo a formação do produto desta metabolização, o óxido nítrico. Adaptado de Piletz et al., 2013.

É reconhecida como um importante neuromodulador no SNC, uma vez que é sintetizada no encéfalo, estocada em vesículas sinápticas, acumulada por captação, liberada de maneira dependente de cálcio por despolarização, metabolizada e degradada a putrescina pela agmatinase e captada por sinaptossomas. Além disso, sua concentração no cérebro é similar ao de alguns neurotransmissores clássicos (LI *et al.*, 1994; FENG, HALARIS e PILETZ, 1997; REIS e REGUNATHAN, 1998a; 2000b; RAASCH *et al.*, 2001; HALARIS e PILETZ, 2007).

Agmatina é amplamente distribuída no SNC de mamíferos. Através da técnica de imunohistoquímica já foi mapeado a localização regional desta substância no córtex cerebral, no mesencéfalo, tronco cerebral, tálamo e hipotálamo. A nível celular primeiramente foi observada a sua presença em neurônios, e posteriormente também foi verificado sua presença em astrócitos e glia (REGUNATHAN *et al.*, 1995; OTAKE *et al.*, 1998; REIS, YANG e MILNER, 1998). Uma vez administrada por via oral, a agmatina é absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída em todo corpo, alcança o SNC pois é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (PILETZ *et al.*, 2003; HAENISCH *et al.*, 2008). Esses dados despertaram interesse pelo estudo do papel e dos efeitos da agmatina no SNC, e diversos estudos baseados na administração exógena de agmatina surgiram. Foi então demonstrado em estudos não clínicos alguns efeitos benéficos deste composto, como neuroproteção (GILAD *et al.*, 1996a), antinociceptivo (FAIRBANKS *et al.*, 2000), ansiolítico e antidepressivo (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; GONG *et al.*, 2006) e melhora na memória (ARTENI *et al.*, 2002).

Já foi identificado alguns alvos através dos quais a agmatina exerce seus efeitos centrais, entre eles já foram descritos sítios de ligação nos receptores imidazólicos, nicotínicos, adrenérgicos do subtipo α_2 , 5-HT_{2A} e 5-HT₃ (LI *et al.*, 1994; REIS e REGUNATHAN, 1998b; 2000a; RAASCH *et al.*, 2001; PILETZ *et al.*, 2013), além de estar bem estabelecido seu papel de bloqueador dos receptores NMDA e de inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que culminam em diminuição do sinalizador pró-inflamatório óxido nítrico (NO) (GALEA *et al.*, 1996; YANG e REIS, 1999b; a; ABE, ABE e SAITO, 2000; REIS e REGUNATHAN, 2000b). Esses mecanismos moleculares auxiliam no entendimento de algumas das propriedades deste composto frente a

doenças do SNC que já foram observadas em testes não clínicos. Particularmente destaca-se a propriedade da agmatina em inibir vias pró-inflamatórias e ativar vias anti-inflamatórias no encéfalo (TAKSANDE *et al.*, 2015), e a capacidade de agir como um sequestrador de radicais livres, prevenindo assim o estresse oxidativo e consequentemente a apoptose (CONDELLO *et al.*, 2011).

Dentre os efeitos da agmatina em situações de dano, já foi demonstrado em roedores seu efeito neuroprotetor frente a isquemia cerebral transitória e focal, por reduzir a zona de infarto e diminuir a perda neuronal devido a excitotoxicidade. A agmatina também se mostrou capaz de prevenir a perda da viabilidade celular de astrócitos em modelos *in vitro* de privação de glicose e oxigênio (GILAD *et al.*, 1996b; FAIRBANKS *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009; AHN *et al.*, 2012). Além disso, em modelos não clínicos de trauma cerebral a agmatina diminui a necrose e o edema e a disfunção da BHE, além de melhorar a função motora, prevenir a perda neuronal, apoptose e gliose (KUO *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2015). Em modelos de lesão da medula espinal tanto por indução química (FAIRBANKS *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2003) quanto mecânica (YU *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2003; KOTIL *et al.*, 2006) o tratamento com agmatina mostrou redução das lesões se administrada cronicamente ou por via intratecal (GORACKE-POSTLE *et al.*, 2006). Estes efeitos citados parecem ser principalmente devido à habilidade da agmatina de antagonizar receptores NMDA e inibir a produção de NO.

Crises epiléticas são resultado de uma excessiva excitabilidade de neurônios com anormal fisiologia e que apresentam aberrante ou anormal sincronia nas redes neurais (SANABRIA, SU e YAARI, 2001). Já foi demonstrado que o tratamento com agmatina apresentou efeito antiepilético frente a modelos de epilepsia induzido por eletrochoques, tanto em ratos como em camundongos, quando administrada via oral (BENCE *et al.*, 2003) e via intracerebroventricular (SU *et al.*, 2004) e em modelo de convulsão mioclônica induzida por pentilenotetrazol quando administrada via intraperitoneal (ARICIOGLU *et al.*, 2003; DEMEHRI *et al.*, 2003). Estes efeitos anticonvulsivantes, parecem ser mediados pela inibição da síntese de NO, bloqueio de receptores NMDA e ativação de receptores adrenérgicos α_2 .

As doenças neurodegenerativas, especialmente as doenças de Parkinson e de Alzheimer são caracterizadas pelo aumento de espécies reativas (ER) e estresse oxidativo, além de neuroinflamação e em última instância perda progressiva e significativa de neurônios (MCGEER, YASOJIMA e MCGEER, 2001; CHEN e ZHONG, 2014; BEN HAIM

et al., 2015). Agmatina, quando administrada após a lesão, diminui a neurotoxicidade dopaminérgica induzida pela toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que mimetiza as condições da doença de Parkinson *in vivo* (GILAD *et al.*, 2005)(MATHEUS *et al.*, 2012; MORETTI *et al.*, 2015). Não somente neste modelo, mas também em modelos de Parkinson *in vitro* induzidos pela rotenona, a agmatina demonstrou proteção frente a injúria em cultura de células de neuroblastoma humano (CONDELLO *et al.*, 2011). Frente a modelos de doença de Alzheimer, no que diz respeito aos aspectos comportamentais, o tratamento com agmatina demonstrou melhora nos prejuízos de memória induzidos por estreptozotocina associado ou não a diabetes (SONG *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2017) ou no modelo induzido pela administração do peptídeo A β_{25-35} (BERGIN e LIU, 2010).

Além desses efeitos citados, a agmatina tem demonstrado efeitos positivos em transtornos psiquiátricos, como ansiedade (LAVINSKY, ARTENI e NETTO, 2003) e também tem sido visto o seu envolvimento em pacientes com esquizofrenia (RICHARDSON-ANDREWS, 1983; DAS I, 1989; RAMCHAND *et al.*, 1994; GILAD *et al.*, 1995; KOPIECZNA-GRZEBIENIAK e GOSS, 2005). Dentro do quadro das doenças psiquiátricas, merecem destaque os efeitos da agmatina no transtorno depressivo.

1.4 AGMATINA E DEPRESSÃO

O envolvimento da agmatina no transtorno depressivo é sustentado por algumas evidências clínicas. Halaris e colaboradores (1999) demonstraram o aumento da agmatina no plasma de pacientes depressivos, que foi o primeiro registro na literatura que indica o envolvimento desta amina na depressão (HALARIS *et al.*, 1999). Bernstein *et al* (2012) após realizar análise imunocitoquímica e morfométrica, encontrou elevado número de células positivas para agmatinase (enzima de degradação da agmatina) em interneurônios hipocampusais em cérebros *post mortem* de pacientes depressivos comparados com pacientes que não apresentavam a doença (BERNSTEIN *et al.*, 2012). Em contrapartida, mais recentemente um estudo de Shopsin (2013) demonstrou que a administração de agmatina (2-3 mg/dia; 3-4 semanas; n=3 em pacientes diagnosticados com depressão maior) foi capaz de exercer um efeito antidepressivo com total remissão dos sintomas. Ainda neste estudo, foi avaliado o

envolvimento do sistema serotoninérgico, para isso os pacientes receberam PCPA (p-clorofenilalanina; inibidor da síntese de serotonina; 250-1250 mg/dia; 1,5-2 semanas), o qual não reverteu os efeitos produzidos pelo tratamento com agmatina exógena, o que sugere que a resposta observada não é dependente dos níveis de serotonina (SHOPSIN, 2013).

Com o objetivo de estabelecer o efeito antidepressivo da agmatina e avaliar seus mecanismos de ação nosso grupo de pesquisa vem investigando os efeitos da agmatina em modelos animais de depressão. Nosso grupo foi o primeiro a demonstrar que a administração de agmatina via intraperitoneal (i.p.) e intracerebroventricular (i.c.v.) apresenta efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos a dois testes preditivos de atividade antidepressiva, TSC e TNF (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002). Posteriormente foi demonstrado em ratos e camundongos, que este efeito também é observado com a administração de agmatina por via oral (p.o.), tanto no TSC quanto no TNF, ou subcutâneo (s.c.) no TNF (LI *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2014b; NEIS *et al.*, 2014b).

Quanto ao mecanismo de ação pelo qual a agmatina exerce o efeito tipo-antidepressivo, têm-se postulado alguns alvos. Já foi observado o envolvimento dos receptores NMDA (antagonismo), inibição da síntese de óxido nítrico (por inibição da enzima de síntese óxido nítrico sintase) (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002), de canais de K⁺ (BUDNI *et al.*, 2007) e interação com os sistemas noradrenérgico (receptores α 2-adrenérgicos), serotoninérgico (receptores 5-HT1A/1B e 5-HT2) (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; ZOMKOWSKI *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2008), opióide (receptores δ - e μ -opioides) (ZOMKOWSKI, SANTOS e RODRIGUES, 2005), imidazólico (receptores I1 and I2) (ZEIDAN *et al.*, 2007) e neuropeptidérgico (receptores Y1) (KOTAGALE *et al.*, 2013).

Além dos efeitos *per se* da agmatina, ela é capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido por alguns protocolos experimentais, como: estresse crônico imprevisível (TAKSANDE *et al.*, 2013; NEIS *et al.*, 2016a), estresse de contenção (FREITAS *et al.*, 2014a; SAHIN *et al.*, 2016), administração de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (NEIS *et al.*, 2014a), administração de lipopolissacarídeo (LPS) (GAWALI *et al.*, 2016), administração de 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) (MORETTI *et al.*, 2015) e ainda da administração crônica de corticosterona (FREITAS *et al.*, 2016). Também foi observado em animais *knockout* para o gene coativador da transcrição de CREB 1 (*Crtc-1*), necessário para expressão de BDNF, aumento da agmatinase

(enzima de degradação da agmatina) no córtex e hipocampo, bem como melhora do comportamento tipo-depressivo apresentado por estes animais com o tratamento de agmatina exógena (MEYLAN *et al.*, 2016).

Quando co-administrada com outros compostos com atividade antidepressiva bem estabelecida, foi observado que a agmatina é capaz de potencializar o efeito tipo-antidepressivo de MK-801, um antagonista dos receptores NMDA, e de antidepressivos convencionais como fluoxetina, imipramina e bupropiona, os quais tem seu mecanismo de ação baseado no aumento de monoaminas (NEIS *et al.*, 2015). De fato isto corrobora com dados já descritos, de que agmatina pode aumentar os níveis de serotonina, dopamina e noradrenalina no hipocampo (TAKSANDE *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2015).

Adicionalmente, demonstrou-se que a agmatina é capaz de ativar algumas vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular. O tratamento crônico (21 dias) com agmatina aumenta a expressão de proteínas fosforiladas envolvidas com neuroplasticidade, como a proteína cinase A (PKA), proteína cinase B (AKT), glicogênio sintase cinase 3 beta (GSK3 β), proteína reguladora de sinal extracelular (ERK1\ERK2) e elemento de resposta a ligação de proteínas (CREB), bem como a expressão de BDNF (FREITAS *et al.*, 2014a). Ainda tem sido demonstrado o envolvimento da via de sinalização mediada pela proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) no efeito antidepressivo agudo da agmatina (NEIS *et al.*, 2016a). Esses achados são de extrema relevância, uma vez que atualmente tem-se evidenciado que a eficácia das terapias antidepressivas depende da promoção da sinaptogênese e da neurogênese devido ao aumento de BDNF, uma vez que esta neurotrofina está reduzida em pacientes depressivos (CHEN *et al.*, 2001; KAREGE *et al.*, 2002; CASTREN, 2004; ABDALLAH *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

A grande limitação encontrada atualmente no tratamento da depressão é que os fármacos disponíveis proporcionam uma remissão completa dos sintomas em apenas cerca de 50% dos indivíduos, além disso, muitos pacientes não respondem ao tratamento (BERTON e NESTLER, 2006; RUHE *et al.*, 2012), além de causarem efeitos colaterais como dor de cabeça, ganho de peso, disfunção sexual,

hipotensão, arritmia, dentre outros (DEMYTTENAERE, 1997; BRUNELLO *et al.*, 2002; SERRETTI e MANDELLI, 2010), o que muitas vezes contribui para diminuir ou dificultar a adesão dos pacientes ao tratamento (BRUNELLO *et al.*, 2002). Isto leva a contínua busca de novos compostos com atividade antidepressiva.

Tendo em vista a necessidade de novos agentes terapêuticos para a depressão e considerando a importante interação entre estresse e a atrofia dendrítica (SHELIN *et al.*, 1996; SAPOLSKY, 2000) no desenvolvimento de depressão, bem como as propriedades antidepressivas (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; ZOMKOWSKI *et al.*, 2004; ZOMKOWSKI, SANTOS e RODRIGUES, 2005; ZEIDAN *et al.*, 2007; FREITAS, NEIS e RODRIGUES, 2016) e pró-neurogênicas já apresentadas pela agmatina (LI *et al.*, 2006; KUO *et al.*, 2011), torna-se relevante ampliar os estudos em relação a ação antidepressiva deste composto em um modelo animal de depressão associado ao estresse.

A agmatina produz efeito antidepressivo em diferentes modelos animais de depressão, sendo assim, se torna imprescindível investigar se este efeito está relacionado com aumento da neurogênese hipocampal, uma vez que estes dados irão auxiliar para uma maior compreensão sobre a ação antidepressiva da agmatina, o que trará contribuições para o meio científico na área, bem como pretende-se trazer sustentação para o futuro desenvolvimento de novas terapias antidepressivas.

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é de que agmatina é capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo, e alterações morfológicas hipocampus induzidas pela corticosterona.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o envolvimento da neurogênese no efeito tipo-depressivo da agmatina em um modelo animal de estresse induzido pela administração crônica de corticosterona em camundongos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito da administração oral crônica de agmatina em um modelo animal de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona:

- 1) Nos comportamentos relacionados a depressão, ansiedade e anedonia;
- 2) Na proliferação celular e diferenciação neuronal no GD do hipocampo;
- 3) No comprimento e arborização dendrítica de neurônios imaturos no GD do hipocampo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 camundongos Swiss fêmeas (30-45 g) com 60 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura de 20-22°C com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h. Os animais foram acondicionados em caixas de 41 × 34 × 16 cm de medida, em grupos de 10 animais em cada caixa. Todas as manipulações foram realizadas entre 9:00 e 14:00 horas. Vinte e quatro horas antes dos testes comportamentais os animais foram ambientados na sala de realização do teste, sendo que cada animal foi submetido ao mesmo teste comportamental apenas uma vez. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA)-Protocolo PP00795. Todos os esforços foram realizados para minimizar ou evitar o sofrimento dos animais.

5.2 FÁRMACOS E TRATAMENTOS

Os seguintes fármacos foram utilizadas: agmatina (0,1 mg/kg, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.), corticosterona (20 mg/kg, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.), fluoxetina (10 mg/kg, Sigma Pharma, SP, Brazil). As drogas foram dissolvidas em água destilada e veículo apropriado, para dissolver a corticosterona utilizou-se como veículo água destilada contendo 2% Tween 80 e 0,2% DMSO. As drogas foram administradas oralmente através da técnica de gavagem em um volume de 10 mL/kg de peso do animal. As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios (FREITAS *et al.*, 2016; PAZINI *et al.*, 2016a; PAZINI *et al.*, 2016b).

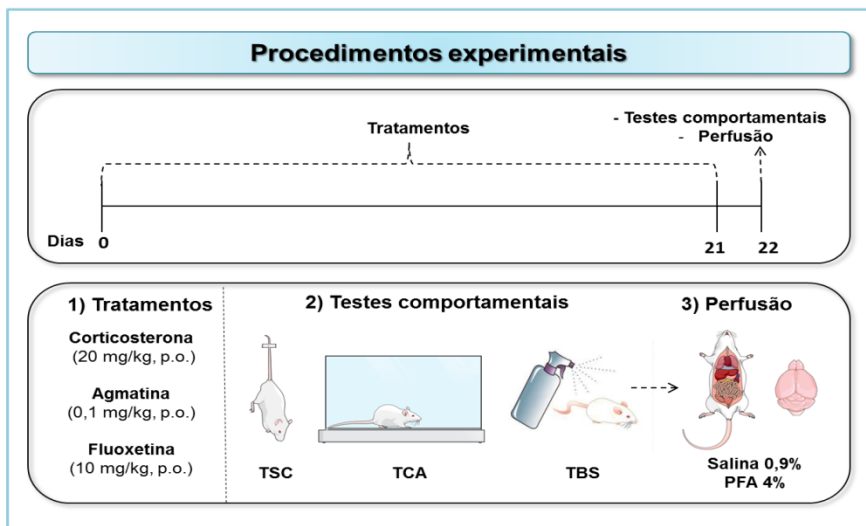
5.2.1 Modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona e tratamentos

Os animais foram inicialmente distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=10 por grupo): i) Controle, ii) Corticosterona, iii) Corticosterona + Agmatina, iv) Corticosterona + Fluoxetina.

O grupo controle recebeu por 21 dias apenas veículo. O comportamento tipo-depressivo foi induzido através da administração de corticosterona (20 mg/kg, p.o.) por 21 dias. Os tratamentos com

fluoxetina (10 mg/kg, p.o., controle positivo) e agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) foram realizados logo após a administração de corticosterona durante os 21 dias. Decorridas 24 horas após a última administração de corticosterona os animais foram submetidos ao TSC, ao teste do campo aberto (TCA) e ao TBS conforme esquematizado na **Figura 5**.

Figura 5- Procedimentos experimentais realizados



Legenda: Os animais receberam via oral por 21 dias: Veículo, Corticosterona (20 mg/kg)+ Veículo, Corticosterona (20 mg/kg) + Agmatina (0,1 mg/kg) ou Corticosterona (20 mg/kg) + Fluoxetina (10 mg/kg). Decorridas 24 horas da última administração, realizou-se os testes comportamentais: TSC, TCA e TBS. Em seguida os animais foram submetidos a perfusão com solução salina e paraformaldeído 4%, sendo o cérebro removido para a realização do protocolo de imunohistoquímica.

5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

5.3.1 *Teste da suspensão pela cauda:*

O tempo total de duração da imobilidade foi medido de acordo com o método STERU *et al.* (1985). Os camundongos, visualmente isolados, foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade foi registrada durante 6 minutos. Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (STERU *et al.*, 1985; MANTOVANI *et al.*, 2003).

5.3.2 *Teste do campo aberto:*

A fim de excluir a possibilidade de que os efeitos comportamentais observados no TSC tenham sido devido a alterações na atividade locomotora causada pelos compostos, os camundongos foram submetidos a uma sessão de 6 minutos no TCA, como descrito por RODRIGUES *et al.* (2002). O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, com o chão dividido em 12 quadrados iguais, sendo considerado os 4 quadrados centrais como centro do campo aberto e os 8 quadrados laterais como a lateral. O momento do teste foi filmado e posteriormente foram contabilizados o número de quadrados cruzados com as quatro patas (cruzamentos) (RODRIGUES *et al.*, 2002), o número de entradas no centro (cruzamento com as quatro patas) e o tempo gasto no centro (PRUT e BELZUNG, 2003). O aparato foi limpo entre o teste de um animal e de outro com etanol 10%, a fim de eliminar possíveis pistas olfatórias.

5.3.3 *Teste de borrifagem de sacarose:*

Dez minutos após o TCA foi realizado o teste de borrifagem de sacarose. Esse teste consiste em borrifar uma solução de sacarose a 10% sobre o dorso do camundongo, que em seguida é individualmente colocado em funil de vidro transparente (MORETTI *et al.*, 2012). Devido a viscosidade da solução de sacarose, os animais iniciam o comportamento de autolimpeza. Após a aplicação da solução, o tempo de latência para autolimpeza e o tempo total de autolimpeza foram mensurados durante 5 minutos, como um índice de autocuidado e comportamento motivacional (WILLNER, 2005). O aparato foi limpo com uma solução de 10% etanol entre os testes a fim de remover vestígios do animal anterior.

5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

5.4.1 Eutanásia

Logo após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 40% e sacrificados por perfusão cardíaca com solução salina 0,9%, seguido de solução de paraformaldeído 4% (PFA). Em seguida o encéfalo foi removido da calota craniana (GIL-MOHAPEL *et al.*, 2013; PAZINI *et al.*, 2016a).

5.4.2 Processamento do Tecido

Após serem removidos, os encéfalos foram mantidos por 24 horas em solução PFA 4% e então transferidos para uma solução de sacarose 30%. Após a saturação do tecido em sacarose, cortes coronais seriados com espessura de 30 μ m foram obtidos utilizando o Vibrátomo (Vibratome, Series 1000, St. Louis, MO, USA ®). As fatias foram coletadas em 1/6 séries e armazenadas em solução tampão fosfato (PBS) contendo 0,5% de azida sódica e mantidas em temperatura de 4 °C.

5.4.3 Imunohistoquímica

Para avaliar a proliferação celular no GD do hipocampo, realizou-se o protocolo de imunohistoquímica para marcar a proteína endógena do ciclo celular Ki-67 e para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O Ki-67 é um marcador mitótico que é expresso durante todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M) (SCHOLZEN e GERDES, 2000), enquanto o PCNA é expresso durante todas as fases ativas do ciclo celular e durante um curto período de tempo, uma vez que as células se tornam pós-mitóticas (INO e CHIBA, 2000; CHRISTIE e CAMERON, 2006). Para tanto, incubou-se duas séries de fatias cerebrais em ácido cítrico 10 mM (dissolvido em PBS 0,1 M, pH=6,0) por 5 minutos em uma temperatura de 95°C, afim de expor os antígenos a serem marcados. Após, as fatias foram lavadas com solução PBS 0,1M, e posteriormente estas foram incubadas com H₂O₂ 3% e metanol 10% (dissolvidos em PBS 0,1M) em temperatura ambiente, para desativação das peroxidases. Seguida de uma lavagem com PBS 0,1 M, o tecido foi bloqueado com solução de bloqueio a 5% (soro de cabra normal a 5% em PBS 0,1 M com Triton X-100 a 0,25%) e incubado com um anticorpo primário policlonal de coelho anti-Ki-67

(1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) ou um anticorpo policlonal de coelho anti-PCNA (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), por um período de 48 horas a 4°C. As fatias foram então incubadas com um anticorpo secundário, IgG de cabra anti-coelho conjugado com biotina (1:200, Vector Laboratories) em solução de bloqueio a 5% à temperatura ambiente por 2 horas.

Com o objetivo de avaliar o comprometimento das células com a linhagem neuronal e a migração celular, realizou-se o protocolo de imunohistoquímica para os marcadores endógenos NeuroD e doblecortina (DCX), respectivamente. NeuroD é um fator de diferenciação neurogênico expresso durante os estágios mais precoces de diferenciação neuronal (MIYATA, MAEDA e LEE, 1999; GAO *et al.*, 2009), enquanto a DCX é uma proteína associada aos microtúbulos especificamente expressa durante a migração de neuroblastos (Neurônios imaturos) (GLEESON *et al.*, 1998; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2003; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2005). Para tanto, incubou-se duas séries diferentes de fatias cerebrais com H₂O₂ 3% e metanol 10% (dissolvidos em PBS 0,1M) por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após a lavagem com PBS 0,1 M, o tecido foi bloqueado com solução de bloqueio a 5% (soro de cavalo normal a 5% em PBS 0,1 M e Triton X-100 a 0,25%) e incubado com um anticorpo primário policlonal de cabra anti- DCX (1:400, Santa Cruz Biotechnology) ou um Anticorpo policlonal primário de cabra anti-NeuroD (1:200, Santa Cruz Biotechnology) por um período de 48 horas a uma temperatura de 4°C. Em seguida, incubou-se as fatias com um anticorpo secundário IgG anti-cabra conjugado com biotina (1:200, Vector Laboratories) dissolvido em solução de bloqueio a 5% à temperatura ambiente durante 2 horas.

Ao final de todos os procedimentos de imunohistoquímica os anticorpos foram visualizados utilizando um sistema complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories) com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) como cromógeno. As fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas (revestidas de gelatina 2%), posteriormente desidratadas em crescentes concentrações de etanol (50%, 70% e 100%), seguido de 5 minutos de incubação em Xilol P.A. e coberto com lâminula fixada com Entellan (Merk, USA).

5.4.4 Quantificação Morfológica

Todas as análises morfológicas foram realizadas utilizando um microscópio Olympus (Olympus BX41, Center Valley, PA, EUA)

equipado com objetivas 20X e 40X. Para a captura de imagens foi utilizado o Microscópio invertido Olympus IX83, equipado com uma câmera digital colorida de 17 megapixels da Olympus DP73, e com auxílio do Programa de captura de imagem CellSens Dimension 1.12. O número total de células imunopositivas para Ki-67, PCNA, NeuroD e DCX presentes na ZSG de todo o GD hipocampal (1,34 a 3,16 a partir do Bregma, seis séries de aproximadamente dez cortes coronais em cada série), a porção dorsal do GD (1,34 a 2,18 a partir do Bregma, cerca de cinco cortes coronais por cérebro/série) e a porção ventral do GD (2,30 a 3,16 a partir do Bregma, aproximadamente cinco cortes coronais por cérebro/série) (PAXINOS, 2001) foram quantificados por contagem manual, através da visualização das células DAB positivas presentes dentro de 2-3 diâmetros da ZSG. Os resultados foram expressos como o número total de células marcadas na sub-região do GD hipocampal multiplicando o número médio de células marcadas por fatia pelo número total de fatias de 30 μ m de espessura contendo a totalidade do GD do hipocampo (60 fatias), a porção dorsal (30 fatias) ou a ventral do GD (30 fatias). As imagens foram processadas com o Microsoft PowerPoint 2010. Apenas aprimoramentos de contraste e ajustes de cores foram feitos.

5.5 ANÁLISE DE SHOLL

O protocolo de análise de Sholl linear (SHOLL, 1953) foi realizado segundo descrito por Wang e colaboradores (2008) com algumas adaptações. Em resumo, uma fatia contendo o hipocampo dorsal foi aleatoriamente selecionada de cada animal de cada um dos grupos experimentais ($n = 5$, exceto o grupo tratado com corticosterona, $n = 4$). As fatias foram observadas em microscópio de luz (Olympus BH-2) com uma ampliação de 1000 X. Cinco campos visuais sem sobreposição foram selecionados aleatoriamente de cada hipocampo dorsal. Selecionou-se de cada campo visual a célula com maior quantidade de ramos dendríticos, da seguinte maneira: uma célula DCX-positiva com ramos dendríticos terciários foi rastreada para cada campo usando câmara lúcida (ampliação de 1000 X). Quando não havia uma célula DCX-positiva com ramos terciários presentes no campo observado, uma célula com ramos secundários foi traçada. Consequentemente, na ausência de células com ramos secundários, uma célula com um ramo primário foi selecionada e rastreada. Este processo

resultou em cinco células DCX-positivas a partir do hipocampo dorsal de cada animal experimental. Os desenhos foram então digitalizados utilizando um scanner de mesa a 300 Dpi. As lâminas e imagens foram identificadas por código de maneira que o experimentador estava “cego” para as condições experimentais. A análise de complexidade dendrítica foi realizada usando um algoritmo de processamento de imagem personalizado escrito em MATLAB (MathWorks®, Natick, MA.) capaz de calcular o número de interseções dendríticas e o comprimento da árvore dendrítica. O processo descrito acima foi repetido para o hipocampo ventral em uma fatia diferente, selecionada aleatoriamente, gerando então um total de 10 células DCX positivas de cada animal (5 de hipocampo dorsal e 5 de hipocampo ventral). Consequentemente, este processo resultou num total de 50 células por grupo experimental (exceto no grupo tratado com corticosterona, $n = 40$).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

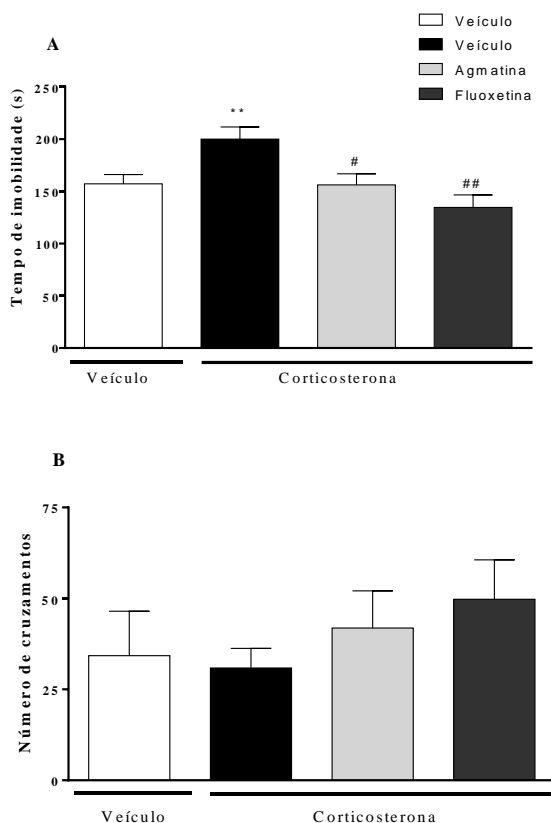
Para os testes comportamentais e quantificação morfológica, as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statística 7 (Tulsa, OK, USA). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Newman Keuls. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$. Para análise de Sholl modificada, os dados de intersecção dendrítica foram analisados por ANOVA de medidas repetidas bidirecionais seguida de teste de *post hoc* Bonferroni. Os dados de comprimento de árvore dendrítica foram analisados por ANOVA de uma via, seguidas do teste de *post hoc* Bonferroni.

6 RESULTADOS

6.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGMATINA E FLUOXETINA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA

Os animais foram tratados por 21 dias com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) + veículo ou apenas com veículo. Paralelamente, dois grupos adicionais foram tratados com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) + fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) ou corticosterona (20 mg/kg, p.o.) + agmatina (0.1 mg/kg, p.o.). Após 24 h os animais foram submetidos ao TSC para avaliar o tempo de imobilidade como parâmetro de comportamento tipo-depressivo, seguido do TCA para avaliação da atividade locomotora. A ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo do tratamento [$F(3, 31) = 6,44$, $p = 0,002$]. A análise de post-hoc revelou que o tratamento crônico com corticosterona induziu um aumento significativo no tempo de imobilidade no TSC, indicativo de um comportamento tipo-depressivo ($p < 0,01$), e este efeito foi prevenido pelo tratamento com fluoxetina ($p < 0,01$) ou agmatina ($p < 0,05$) (**Figura 6 A**). Para descartar algum possível efeito dos tratamentos na atividade locomotora dos animais, estes foram submetidos ao TCA. A administração crônica de corticosterona ou os tratamentos com fluoxetina ou agmatina não apresentaram efeitos significativos no número de cruzamentos realizados pelos animais [$F(3, 36) = 2,36$, $p = 0,09$] (**Figure 6 B**).

Figura 6- Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina e fluoxetina no TSC e TCA

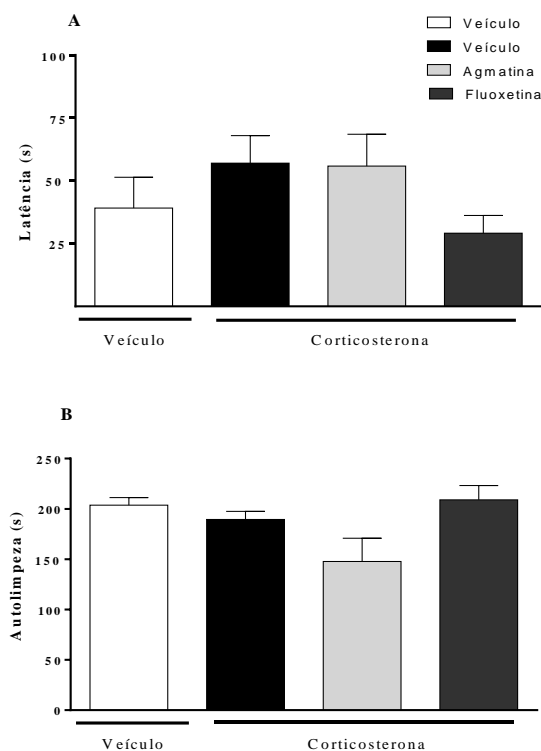


Legenda: Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) no TSC (A) e TCA (B). Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=8-10 animais) e os resultados foram analisados com ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. ** P < 0,01 em comparação com o grupo tratado com veículo, # P < 0,05 e ## P < 0,01 em comparação com o grupo tratado com corticosterona e veículo, respectivamente.

6.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGMATINA E FLUOXETINA EM ANIMAIS EXPOSTOS A ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA NO COMPORTAMENTO ANEDÔNICO

Para avaliar o efeito da corticosterona, fluoxetina e agmatina no comportamento anedônico, os animais foram submetidos ao TBS, no qual os parâmetros avaliados foram a latência para iniciar a primeira autolimpeza e o tempo total de autolimpeza. A ANOVA de uma via demonstrou que não houve diferença significativa na latência para iniciar a autolimpeza [$F(3, 36)=1,51, p=0,22$] (**Figura 7 A**) ou no tempo total de autolimpeza [$F(3, 35)=2,48, p=0,07$]. (**Figura 7 B**), o que sugere que estes animais não apresentam um fenótipo anedônico.

Figura 7- Avaliação do comportamento relacionado à anedonia da agmatina e fluoxetina no TBS

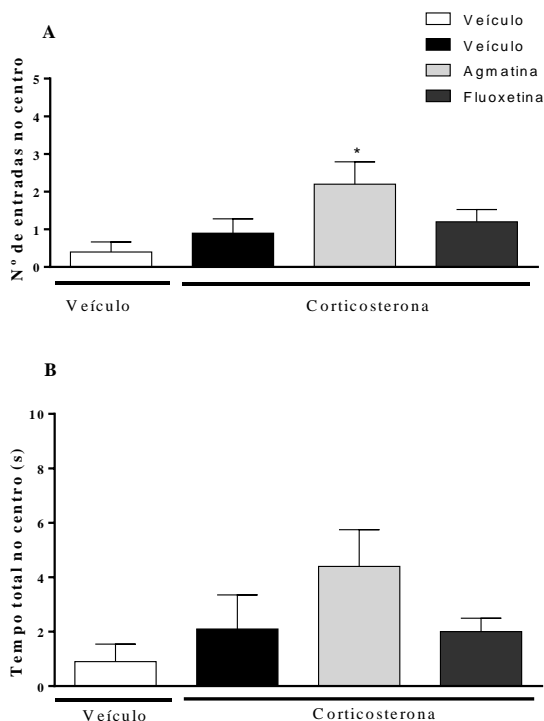


Legenda: Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) na latência para iniciar a autolimpeza (A) ou no tempo de autolimpeza (B) no TBS. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=8-10 animais) e os resultados foram analisados com ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos.

6.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGMATINA E FLUOXETINA EM ANIMAIS EXPOSTOS A ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CORTICOSTERONA NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

Para avaliar o efeito de corticosterona, fluoxetina e agmatina no comportamento tipo-ansioso, foram analisados o número de entradas no centro do campo aberto e o tempo de permanência no centro da arena, como parâmetro de comportamento tipo-ansioso. A ANOVA de uma via revelou diferença significativa dos tratamentos [$F(3, 36) = 3,43$, $p = 0,03$] no número de entradas no centro da arena (**Figura 8 A**). Além disso, o tempo total gasto no centro da arena também foi registrado, contudo não foram observadas diferenças significativas neste parâmetro [$F(3, 36) = 2,15$, $p = 0,110$] entre os diferentes grupos (**Figura 8 B**). Em geral, estes resultados sugerem que, além das suas propriedades antidepressivas, a agmatina também pode apresentar ação ansiolítica em um modelo de estresse induzido pela administração crônica de corticosterona.

Figura 8- Avaliação do efeito tipo-ansiolítico da agmatina e fluoxetina no TCA



Legenda: Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) no número de entradas (A) ou no tempo de permanência no centro do campo aberto (B) avaliados no TCA. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=8-10 animais) e os resultados foram analisados com ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. * P <0,05 em comparação com o grupo tratado com veículo.

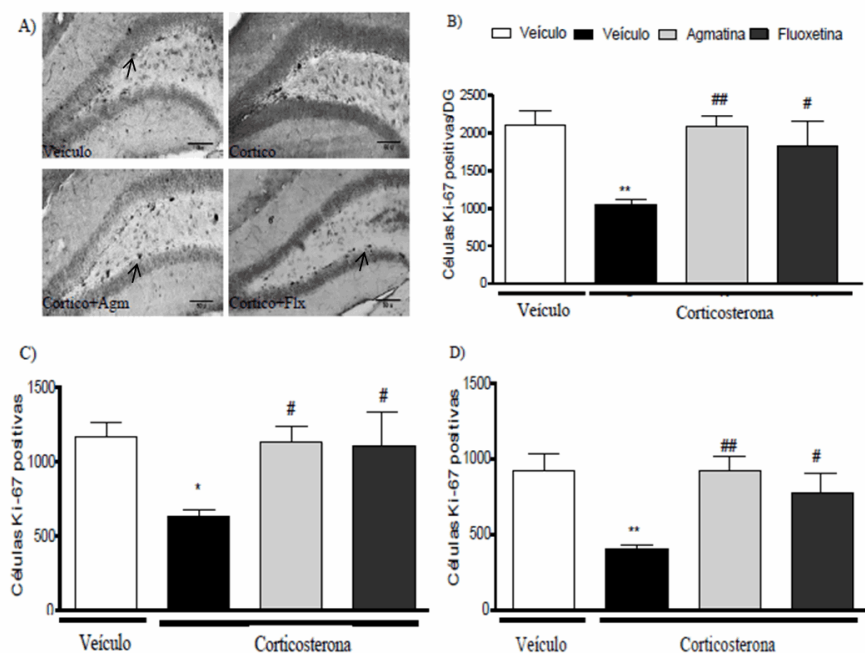
6.4 EFEITOS DA CORTICOSTERONA, AGMATINA E FLUOXETINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO

Para avaliar o efeito do tratamento com agmatina e fluoxetina sobre a proliferação celular hipocampal após a administração crônica de corticosterona, foi realizado imunohistoquímica para o marcador Ki-67, um marcador endógeno de ciclo celular que é expresso durante todas as fases ativas do ciclo celular (SCHOLZEN e GERDES, 2000). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento no número de células Ki-67 positivas em toda a ZSG no GD do hipocampo [$F(3, 27)=5,7435$, $p=0,00357$]. O teste *post hoc* revelou uma diminuição significativa no número de células em proliferação no grupo tratado com corticosterona + veículo, quando comparado com o grupo tratado apenas com veículo ($p<0,05$). Este efeito foi revertido pelo tratamento tanto com agmatina ($p<0,05$) como com fluoxetina ($p<0,05$) (**Figura 9 A**). Também a proliferação celular na porção ventral e dorsal no GD do hipocampo foram avaliadas separadamente. Similar ao que foi observado em todo o GD, um efeito significativo foi detectado pela ANOVA de uma via no GD ventral [$F(3, 26)=3,7590$, $p=0,02292$] (**Figura 9 B**) e no GD dorsal [$F(3, 26)=6,7670$, $p=,00160$] (**Figura 9 C**). As análises *post hoc* revelaram que o tratamento com corticosterona crônica resultou numa redução do número de células Ki-67 positivas na porção ventral ($p <0,05$) e dorsal ($p <0,01$) do GD do hipocampo. Além disso, os tratamentos com agmatina e fluoxetina foram capazes de reverter essa redução nas duas subregiões do GD (GD ventral: $p <0,05$, **Figura 9 B**; GD dorsal: $p <0,01$; **Figura 9 C**).

A proliferação celular hipocampal também foi avaliada através de imunohistoquímica para PCNA, um outro marcador endógeno expresso durante as fases ativas do ciclo celular por um curto período uma vez que as células se tornam pós-mitóticas (INO e CHIBA, 2000; CHRISTIE e CAMERON, 2006). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento no número total de células PCNA positivas em toda a ZSG no GD do hipocampo [$F(3, 15)=4,60$, $p=0,02$]. Porém, a análise *post hoc* posterior não revelou nenhuma diferença significativa no número de células positivas para PCNA entre os grupos tratados com corticosterona + veículo e o grupo que recebeu apenas veículo. No entanto, a co-administração de agmatina ($p <0,05$) ou fluoxetina ($p <0,05$) com corticosterona aumentou significativamente o número de células PCNA positivas ao longo de todo o eixo do GD (**Figura 10 A**).

Curiosamente, esse efeito parece estar localizado no GD ventral [F (3, 16) = 4,37, $p = 0,02$] (**Figura 10 B**), onde também observa-se um aumento significativo no número de células PCNA positivas no grupo tratado com agmatina ($p < 0,05$). Por outro lado, no GD dorsal, a análise estatística não revelou um efeito significativo do tratamento [F (3, 16) = 2,11, $p = 0,14$] (**Figura 10 B**).

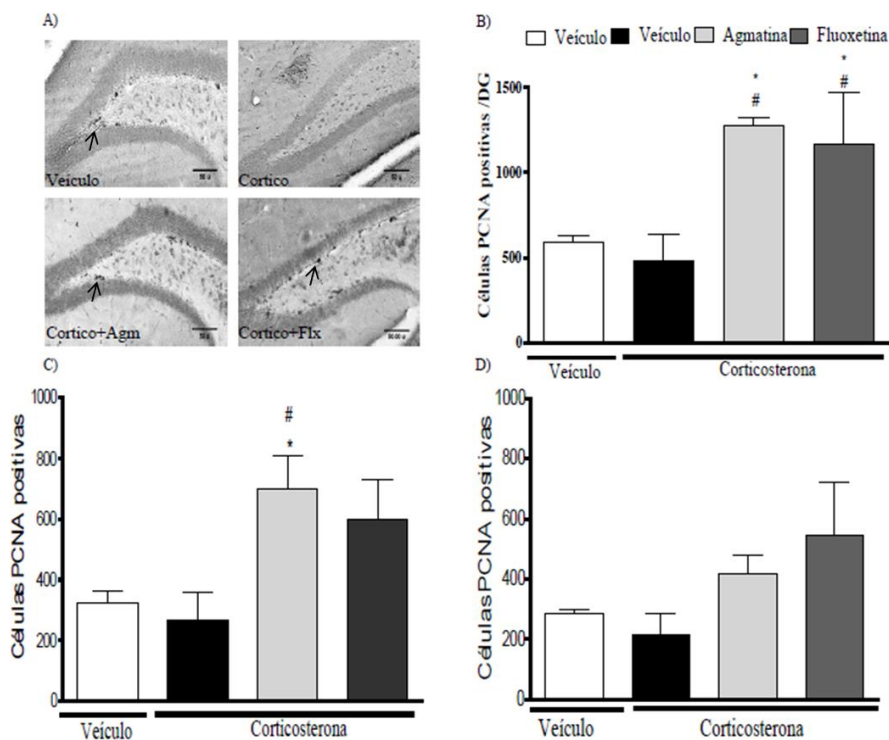
Figura 9- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre o número de células Ki-67- positivas



Legenda: Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) sobre a proliferação celular na ZSG do GD hipocampal avaliado por imunohistoquímica para Ki-67. A) Fotomicrografias representativas (região dorsal) dos efeitos da administração crônica de agmatina ou fluoxetina na expressão do marcador proliferativo endógeno Ki-67 no GD do hipocampo de animais tratados com corticosterona ou veículo em um aumento de 200X (barra de escala = 50 μ m). B) Células Ki-67 positivas em todo o giro denteado do hipocampo. C) células Ki-67 positivas na

porção ventral e D) na porção dorsal do hipocampo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. ($n=8-10$ animais) e os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em comparação com o grupo tratado com veículo; # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$, em comparação com o grupo tratado com corticosterona.

Figura 10- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre o número de células PCNA - positivas



Legenda: Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) sobre a proliferação celular na ZSG do giro dentado do hipocampo avaliado por imunohistoquímica para PCNA. A) Fotomicrografias representativas (região dorsal) dos efeitos da administração crônica de agmatina ou fluoxetina na expressão do marcador proliferativo endógeno PCNA no GD do hipocampo de

animais tratados com corticosterona ou veículo em um aumento de 200X (barra de escala = 50 μ m). B) Células PCNA positivas em todo o giro denteado do hipocampo. C) células PCNA positivas na porção ventral e D) na porção dorsal do hipocampo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. (n=5 animais) e os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo; # $P < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com corticosterona. Fotomicrografias representativas dos efeitos da administração crônica de agmatina ou fluoxetina na expressão do marcador proliferativo endógeno PCNA no GD do hipocampo de animais tratados com corticosterona ou veículo em um aumento de 200X (barra de escala = 50 μ m).

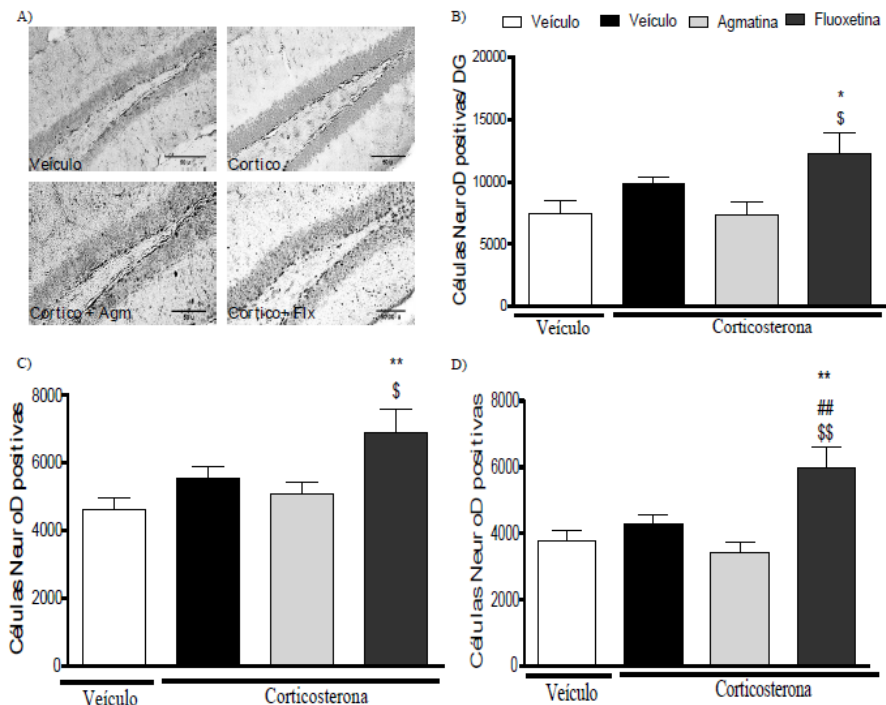
6.5 EFEITOS DA CORTICOSTERONA, AGMATINA E FLUOXETINA NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO

Para avaliar os efeitos do tratamento com agmatina ou fluoxetina sobre a diferenciação neuronal no hipocampo após a administração crônica de corticosterona, foi realizado a imunohistoquímica para o fator de transcrição NeuroD, que é expresso especificamente durante a diferenciação de neurônios no GD do hipocampo (MIYATA, MAEDA e LEE, 1999). A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento sobre o número total de células NeuroD-positivas presentes ao longo de toda a ZSG do GD do hipocampo [$F(3, 32) = 3,80$, $p = 0,02$] (**Figura 11 A**). No entanto, o teste *post hoc* revelou apenas um aumento significativo no número de neurônios imaturos positivos para NeuroD no GD de animais tratados com corticosterona + fluoxetina quando comparados com o grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,05$). Por outro lado, animais tratados com corticosterona + veículo ou corticosterona + agmatina mostraram níveis semelhantes de comprometimento neuronal no GD se comparados com os animais tratados com veículo. Resultados semelhantes também foram obtidos tanto na subregião ventral [$F(3, 31) = 4,20$, $p = 0,01$] (**Figura 11 B**) quanto na dorsal [$F(3, 32) = 7,47$, $p = 0,0006$] (**Figura 11 C**) do GD do hipocampo, onde o tratamento com corticosterona + fluoxetina causou um aumento significativo no número de células positivas para NeuroD, tanto na subregião ventral ($p < 0,01$ se comparado com o grupo

que recebeu veículo, $p < 0,05$ se comparado com o grupo corticosterona+agmatina) e subregião dorsal ($p < 0,01$ em comparação com todos os outros grupos de tratamento) do GD.

Além disso, para avaliar os efeitos do tratamento com agmatina ou fluoxetina na diferenciação neuronal do hipocampo após administração crônica de corticosterona, imunohistoquímica para DCX, uma proteína do citoesqueleto expressa em neurônios imaturos (ou seja, neuroblastos) (GLEESON *et al.*, 1998; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2003; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2005) foi realizada. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento sobre o número total de células DCX positivas presentes ao longo de toda a ZSG do GD do hipocampo [$F(3, 30) = 26,16$, $p = 0,00001$] (**Figura 12 A**). O teste *post hoc* revelou que embora os animais tratados com corticosterona tenham apresentado níveis semelhantes de diferenciação neuronal no GD quando comparados com o grupo tratado apenas com veículo, tanto a fluoxetina ($p < 0,01$) como a agmatina ($p < 0,05$) aumentaram significativamente o número de células DCX positivas em animais tratados com corticosterona. Resultados semelhantes também foram obtidos tanto na subregião ventral [$F(3, 30) = 19,93$, $p = 0,00001$] (**Figura 12 B**), como na subregião dorsal do GD [$F(3, 30) = 27,86$, $p = 0,00001$] (**Figura 12 C**). Ao analisar individualmente cada subregião, o teste *post hoc* revelou que tanto o tratamento com fluoxetina ($p < 0,01$) quanto com agmatina ($p < 0,05$) resultou em aumentos significativos no número de neuroblastos DCX-positivos em ambas subregiões do GD.

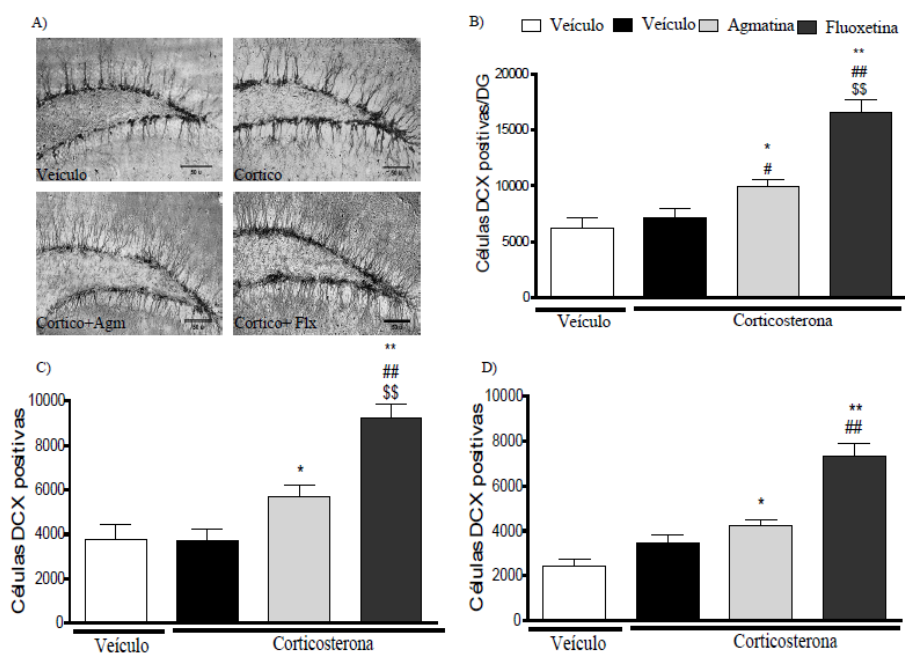
Figura 11- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a expressão de células NeuroD - positivas



Legenda: Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) sobre a diferenciação celular na ZSG do giro denteado do hipocampo avaliado por imunohistoquímica para NeuroD. A) Fotomicrografias representativas (região ventral) dos efeitos da administração crônica de agmatina ou fluoxetina na expressão do marcador proliferativo endógeno NeuroD no GD do hipocampo de animais tratados com corticosterona ou veículo em um aumento de 200X (barra de escala = 50 μ m). B) Células NeuroD positivas em todo o giro denteado do hipocampo. C) células NeuroD positivas na porção ventral e D) na porção dorsal do hipocampo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. (n=8-10 animais) e os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. * P < 0,05 e ** P < 0,01, em comparação com o grupo tratado com veículo; ## P < 0,01, em comparação com o grupo tratado

com corticosterona; \$ P <0,05 e \$\$ P <0,01, em comparação com o grupo tratado com corticosterona e agmatina. Fotomicrografias representativas dos efeitos da administração crônica de agmatina ou fluoxetina na expressão do NeuroD no GD do hipocampo de animais tratados com corticosterona ou veículo em um aumento de 200X (barra de escala = 50 μ m).

Figura 12- Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a expressão de células DCX - positivas



Legenda- Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) sobre a diferenciação celular na ZSG do giro dentado do hipocampo avaliado por imunohistoquímica para DCX. A) Fotomicrografias representativas (região dorsal) dos efeitos da administração crônica de agmatina ou fluoxetina na expressão do marcador proliferativo endógeno PCNA no GD do hipocampo de animais tratados com corticosterona ou veículo em um aumento de

200X (barra de escala = 50 μ m). B) Células PCNA positivas em todo o giro denteado do hipocampo. C) células PCNA positivas na porção ventral e d) na porção dorsal do hipocampo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. (n=8-10 animais) e os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. * P <0,05 e ** P <0,01, em comparação com o grupo tratado com veículo; # P <0,05 e ## P<0,01, em comparação com o grupo tratado com corticosterona; \$ P <0,05 e \$\$ P <0,01, em comparação com o grupo tratado com corticosterona e agmatina.

6.6 EFEITOS DA CORTICOSTERONA, AGMATINA E FLUOXETINA NO COMPRIMENTO E ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA DE NEURÔNIOS IMATUROS NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO

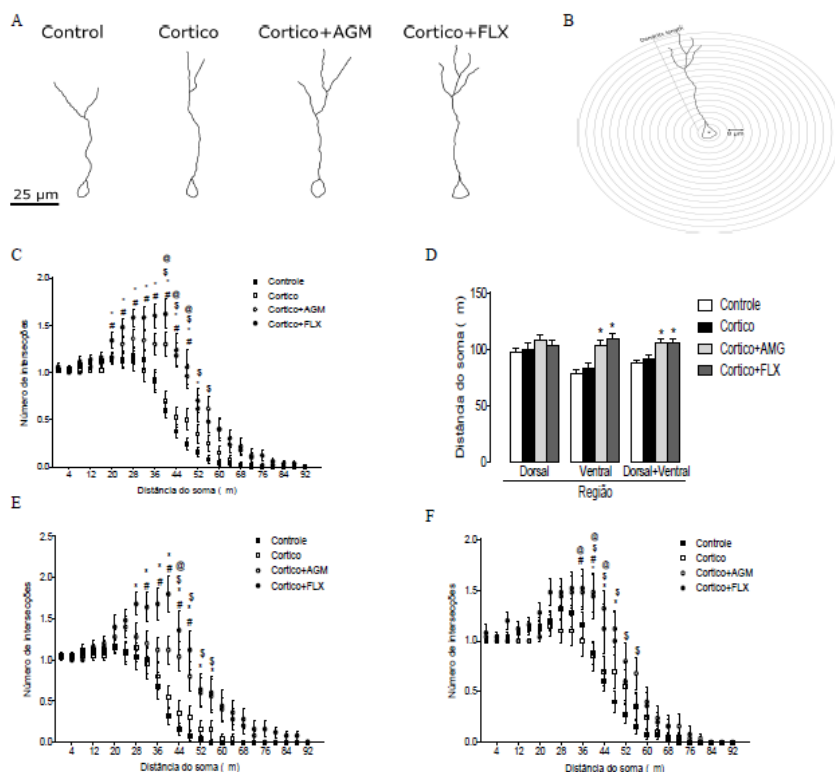
Para avaliar os efeitos do tratamento com agmatina ou fluoxetina sobre o comprimento e arborização dendrítica de neurônios imaturos no GD do hipocampo após a administração crônica de corticosterona, foi realizado a imunohistoquímica para a proteína DCX, e posteriormente as amostras foram submetidas à análise de Sholl modificada (RISTANOVIC, MILOSEVIC e STULIC, 2006; WANG *et al.*, 2008).

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento sobre o número de intersecções presentes ao longo do dendrito de células DCX positivas [F (69, 4464) = 4,052] (**Figura 13 A**). No entanto, o teste *post hoc* revelou apenas um aumento significativo do número de intersecções presentes ao longo do dendrito ocorreu em animais tratados com fluoxetina + corticosterona e agmatina + corticosterona, em alguns pontos específicos da distância do soma (p <0,05). O mesmo foi observado quando analisou-se as subregiões separadamente, ventral [F (69, 2184) = 3,243] (**Figura 13 E**) e dorsal [F (69, 2184) = 1,564] (**Figura 13 F**). De forma similar, o teste *post hoc* revelou que apenas os tratamentos com fluoxetina + corticosterona ou agmatina + corticosterona foram capazes de aumentar o número de intersecções em alguns pontos específicos do dendrito, tanto na porção ventral (p <0,05) quanto na dorsal (p <0,05).

A ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo do tratamento sobre o comprimento dos dendritos (a partir do soma) (**Figura 13 D**). O teste *post hoc* revelou que houve um aumento

significativo do comprimento dos dendritos de maneira região dependente com o tratamento crônico com agmatina + corticosterona ($p < 0,05$) ou com o tratamento crônico com fluoxetina + corticosterona ($p < 0,05$), em relação ao grupo que recebeu apenas veículo. Este efeito do tratamento foi mais evidente na subregião ventral do GD do hipocampo.

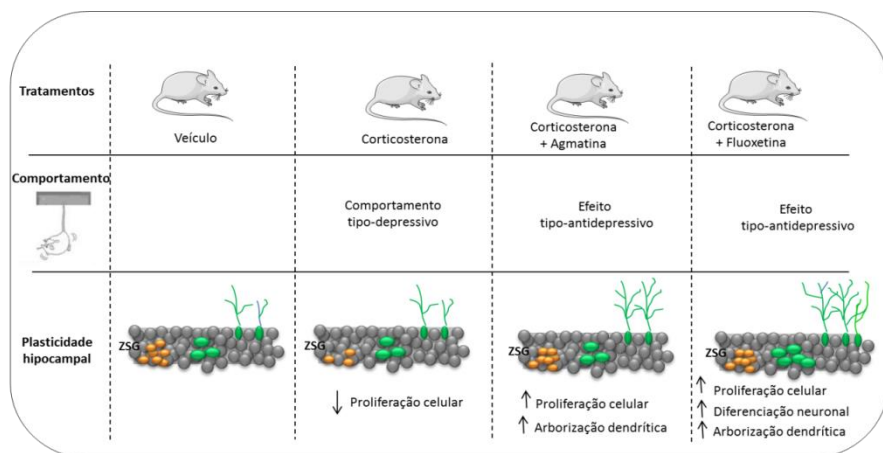
Figura 13 - Avaliação da influência da agmatina e fluoxetina sobre a complexidade dendrítica



Legenda: Efeitos da administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em animais tratados com veículo ou corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) sobre a arborização dendrítica avaliada por análise de Sholl. Imagem representativa de neurônios DCX

positivos desenhados para análise de Sholl modificada (barra de escala = 25 μm). (A). Imagem representativa de um neurônio DCX positivo com o corpo neuronal posicionado no centro do raio das esferas (B). Arborização dendrítica e distância dendrítica a partir do soma representado pelo número de intersecções em relação à distância do soma, das duas subregiões analisadas (C) ou da subregião ventral (E) e da subregião dorsal (F) separadamente. Representação da média das distância total a partir do soma (D). Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. (n=5-4 animais) e os resultados foram analisados por ANOVA de uma via ou ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni . * $P < 0,05$, comparando os animais tratados com corticosterona + fluoxetina com o grupo tratado com veículo; # $P < 0,05$, comparando os animais tratados com corticosterona + fluoxetina com o grupo tratado com corticosterona; \$ $P < 0,05$ comparando os animais tratados com corticosterona + agmatina com o grupo tratado com veículo; @ $P < 0,05$, comparando os animais tratados com corticosterona + agmatina com o grupo tratado com corticosterona. CORTICO= corticosterona, Agm= agmatina, Flx= Fluoxetina.

Na figura a seguir está demonstrado um resumo dos principais achados deste trabalho (Figura 14).

Figura 14- Resumo dos resultados

Legenda: Representação esquemática dos principais resultados do trabalho. A agmatina, assim como a fluoxetina, foi capaz de reverter o comportamento depressivo no TSC, induzido pela administração crônica de corticosterona. Estes efeitos comportamentais foram acompanhados por um efeito protetor diante da redução da proliferação celular no ZSG do GD do hipocampo, induzida pela corticosterona. A fluoxetina, mas não a agmatina, foi capaz de aumentar a diferenciação neuronal do hipocampo. Ambos os tratamentos foram capazes de aumentar a arborização e o comprimento dos dendritos na ZSG do hipocampo. Em conjunto, estes resultados sugerem que o aumento da proliferação e da complexidade dendrítica promovidos pela agmatina podem explicar, pelo menos em parte, o efeito antidepressivo da agmatina. ZSG= Zona subgranular.

7 DISCUSSÃO

O transtorno depressivo maior está intimamente relacionado à exposição ao estresse crônico, uma vez que indivíduos expostos a situações de vida estressantes têm um forte risco de desenvolver episódios depressivos, que são frequentemente associados a sintomas ansiosos (MAZURE *et al.*, 2000; KENDLER *et al.*, 2003; DE KLOET, JOELS e HOLSBOER, 2005; DE KLOET *et al.*, 2016; KUMAR e MONDAL, 2016). Consideráveis evidências indicam que a administração repetida de corticosterona em roedores mimetiza as alterações neuroquímicas e comportamentais provocadas pelo estresse e semelhantes às observadas em pacientes depressivos. Pesquisas demonstram que este protocolo é capaz de aumentar o tempo de imobilidade de ratos no TSC e no TNF, e provoca comportamento anedônico, já demonstrado pelo consumo reduzido de sacarose, ambos considerados alterações comportamentais que replicam sintomas depressivos. Desta maneira já está bem consolidado que este modelo de depressão apresenta validade de face (causa sintomas relacionados à doença), de constructo (reproduz características fisiopatológicas semelhantes à condição humana) e validade preditiva (o tratamento repetido com antidepressivos utilizados na clínica pode reverter as alterações do modelo) (MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; ZHAO *et al.*, 2009; KOIKE, IJIMA e CHAKI, 2013; PAZINI *et al.*, 2015; DEMUYSER *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2016).

No presente estudo, o tratamento crônico com corticosterona induziu um comportamento tipo-depressivo, demonstrado através do aumento no tempo de imobilidade no TSC, este efeito foi revertido pelo tratamento com o antidepressivo convencional fluoxetina, bem como com agmatina. O comportamento tipo-depressivo causado pela administração crônica com corticosterona, demonstrado neste estudo, está em acordo com estudos prévios que utilizaram o mesmo protocolo empregado neste estudo (PAZINI *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2016), ou com diferentes doses de corticosterona e vias de administração, bem como diferentes linhagens animais (FENTON *et al.*, 2015; GONG *et al.*, 2016; WENG *et al.*, 2016). Este resultado não pode ser atribuído a uma redução da atividade locomotora dos animais, uma vez que a administração de corticosterona não alterou significativamente a locomoção no teste do campo aberto. Além disso, o presente resultado também corrobora com dados já descritos na literatura de que a

fluoxetina é capaz de reverter o efeito tipo-depressivo induzido pela administração crônica de corticosterona, demonstrado através da diminuição do tempo de imobilidade no TSC (ALI *et al.*, 2015; PAZINI *et al.*, 2016a; WENG *et al.*, 2016). Com relação à agmatina, seus efeitos antidepressivos já foram demonstrados no mesmo modelo de depressão (FREITAS *et al.*, 2016), bem como em diferentes modelos animais desse transtorno de humor, incluindo o induzido por exposição ao estresse de contenção agudo (FREITAS *et al.*, 2014b), estresse crônico imprevisível (NEIS *et al.*, 2016a), administração do fator de necrose tumoral (TNF- α) (NEIS *et al.*, 2014a) ou administração de lipopolissacarídeo (LPS) (GAWALI *et al.*, 2016).

O TSC utilizado neste estudo, é um dos testes mais utilizados na pesquisa não clínica para avaliação de compostos com atividade antidepressiva, consiste na mensuração do tempo de imobilidade dos animais submetidos a uma situação inescapável, sendo que uma redução deste tempo é considerado como um efeito tipo-antidepressivo (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002; MCARTHUR e BORSINI, 2006). Já está bem consolidado, que no TSC diversas classes de antidepressivos como ISRS, antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima monoamina oxidase, bem como compostos com esta propriedade reduzem o tempo de imobilidade dos animais (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977; STERU *et al.*, 1985). Apesar do risco de fármacos com atividade psicoestimulante possibilitarem um resultado falso-positivo no TSC, neste estudo esta possibilidade foi descartada, uma vez que os efeitos comportamentais causados pelo tratamento não foram associados a uma ação psicoestimulante, pois os grupos experimentais que apresentaram uma redução no tempo de imobilidade no TSC, não demonstraram alterações significativas na atividade locomotora no TCA, validando assim o resultado apresentado.

Levando em consideração a comorbidade existente entre depressão e ansiedade, o presente estudo também avaliou os efeitos da agmatina nos comportamentos relacionados à ansiedade, avaliando os parâmetros de número de entradas e o tempo gasto no centro do campo aberto. A administração crônica de corticosterona, apesar de promover um comportamento tipo-depressivo, não induz um comportamento tipo-ansioso nos camundongos, no protocolo testado. Esses achados são consistentes com outros estudos, nos quais a administração crônica de corticosterona não resultou em um aumento nos comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (GREGUS *et al.*, 2005; DEMUYSER *et al.*, 2016). No entanto, o tratamento com agmatina apresentou um efeito ansiolítico, o que foi demonstrado através do

aumento significativo do número de entradas no centro do campo aberto. Este dado reforça as propriedades ansiolíticas já relatadas da agmatina, que foram observadas após administração única ou repetida deste composto, tanto em ratos como em camundongos (LAVINSKY, ARTENI e NETTO, 2003; GONG *et al.*, 2006; TAKSANDE *et al.*, 2014). É importante destacar que este efeito adicional da agmatina é de extrema relevância, uma vez que muitos antidepressivos disponíveis não apresentam efeito ansiolítico, além disso, quando a depressão está associada à ansiedade, é relatada uma incidência significativamente maior de ideação suicida, bem como de disfunção social e ocupacional (ADAMS *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram que a liberação excessiva de glicocorticóides é capaz de afetar a plasticidade hipocampal, causar atrofia dendrítica e diminuição da proliferação celular bem como a diferenciação neuronal no GD do hipocampo, mecanismos que parecem estar correlacionados com o desenvolvimento de um comportamento depressivo (LANFUMEY *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008; DUMAN, 2014). Complementarmente a isto, a aplicação de diferentes protocolos de administração crônica de corticosterona (variadas vias de administração e variadas concentrações) em roedores, demonstram que a indução de um comportamento tipo-depressivo causada por este glicocorticóide pode estar associado a redução da proliferação celular (CRUPI *et al.*, 2010; CRUPI *et al.*, 2011) ou da diferenciação neuronal (FENTON *et al.*, 2015; HILL, SAHAY e HEN, 2015) no GD do hipocampo, ou ainda pode estar relacionado a estes dois eventos (HU *et al.*, 2012; PAZINI *et al.*, 2016a; SIOPI *et al.*, 2016; ZHANG, K. *et al.*, 2016a; ZHANG, K. *et al.*, 2016b). Para avaliar os efeitos da administração de corticosterona exógena na proliferação celular, nós utilizamos um protocolo de imunohistoquímica para marcadores endógenos expressos durante a divisão celular: Ki-67 e PCNA (KURKI *et al.*, 1986; KEE *et al.*, 2002). No presente estudo demonstrou-se que a administração crônica de corticosterona diminuiu significativamente a proliferação celular no GD do hipocampo, evidenciada pela diminuição de células Ki-67 e PCNA positivas, dois marcadores de ciclo celular endógenos diferentes. Por outro lado, tanto a agmatina como a fluoxetina foram capazes de prevenir esta diminuição da proliferação celular hipocampal induzida pela corticosterona, um efeito que pode estar subjacente, pelo menos em parte, às propriedades antidepressivas destes dois compostos. Realmente, a capacidade de promover a neurogênese hipocampal em geral e a proliferação celular em particular, parece desempenhar um papel crucial nos mecanismos de ação dos

fármacos antidepressivos (SANTARELLI *et al.*, 2003; BESSA *et al.*, 2009).

O hipocampo é constituído de duas estruturas funcionalmente distintas: a subregião dorsal e a ventral (FANSELOW e DONG, 2010). O hipocampo dorsal (equivalente ao hipocampo posterior em primatas) se conecta à área tegmental ventral através do septo, e envia projeções para o córtex cingulado anterior e para sua porção ventral. Esta sub-região está especificamente envolvido na aprendizagem espacial e na memória. Já o hipocampo ventral se conecta diretamente ao córtex pré-frontal medial, hipotálamo, amígdala e à área tegmental ventral através do núcleo acumbens. Esta porção está principalmente implicada na regulação das respostas ao estresse, emoções e afeto (BANNERMAN *et al.*, 2004; DEGROOT e TREIT, 2004)(PAXINOS, 2010; TANNENHOLZ, JIMENEZ e KHEIRBEK, 2014).

É interessante observar que o aumento da proliferação celular em todo o GD hipocampal promovida pelos tratamentos (agmatina e fluoxetina) foi observado com os dois marcadores , Ki-67 e PCNA. Porém, ao avaliar individualmente cada subregião somente o marcador Ki-67 manteve resultados similares, enquanto que com o marcador PCNA o aumento da proliferação celular apenas foi evidenciado pelo tratamento com agmatina na subregião ventral, bem como não foi observado redução causada pela corticosterona. Este resultado pode ser explicado pelo fato do PCNA ser expresso por um curto período de tempo durante o ciclo celular (INO e CHIBA, 2000) o que pode limitar a detecção das células em divisão. Isso também sugere que a agmatina pode aumentar preferencialmente a proliferação celular na subregião ventral do GD do hipocampo.

O efeito antidepressivo de vários antidepressivos convencionais e compostos com atividade antidepressiva tem sido associado ao aumento da neurogênese na porção ventral do hipocampo (BETTIO *et al.*, 2016; PAZINI *et al.*, 2016a; ZHOU *et al.*, 2016). Entretanto no presente estudo, a fluoxetina e a agmatina aumentaram significativamente o número de células Ki-67-positivas tanto no hipocampo ventral como no hipocampo dorsal de camundongos expostos a corticosterona. Apesar das razões para essas discrepâncias não serem totalmente compreendidas, as diferenças entre os grupos de animais utilizadas nos vários estudos, bem como os protocolos de administração de fármacos e/ou avaliação da proliferação de células do hipocampo podem explicar, pelo menos em parte, estes resultados. Além disso, alguns estudos em roedores também já encontraram resultados similares ao nosso, demonstrando a associação entre a

diminuição do comportamento tipo-depressivo e o aumento de proliferação em todo o GD após tratamento com fluoxetina (SATVAT *et al.*, 2012; KLOMP *et al.*, 2014).

Além da proliferação celular, o presente estudo também avaliou o comprometimento para um fenótipo neuronal (através da imunohistoquímica para o marcador NeuroD) e diferenciação neuronal (através de imunohistoquímica para o marcador DCX). Contrário ao que relatamos anteriormente (PAZINI *et al.*, 2016), neste estudo, a exposição crônica à corticosterona não afetou significativamente o número de neurônios imaturos NeuroD e DCX positivos no GD do hipocampo. Embora as razões para isso ainda não sejam totalmente compreendidas, elas podem estar relacionadas com a endogamia da nossa colônia de camundongos e o consequente desenvolvimento de uma resistência parcial aos efeitos deletérios da exposição crônica à corticosterona. As linhagens de animais por si só podem mostrar variação comportamental fenotípica influenciando na respostas de testes comportamentais, quando trata-se de linhagens endogâmicas nota-se ainda variabilidade nas respostas individuais (JACOBSON e CRYAN, 2007). Embora em nossos estudos anteriores este mesmo modelo de administração crônica de corticosterona fosse caracterizado tanto pelo aumento do tempo de imobilidade no TSC e TNF como pelo comportamento anedônico (avaliado pelo teste de consumo de sacarose) (PAZINI *et al.*, 2016), em estudos mais recentes do nosso grupo com o mesmo protocolo experimental não foi possível reproduzir o comportamento anedônico em um modelo de estresse crônico imprevisível (NEIS *et al.*, 2016a), como demonstrado no presente estudo pela falta de efeito da administração crônica de corticosterona no TBS (que também avalia parâmetros de anedonia) (FREITAS *et al.*, 2016).

Além disso, um estudo comparando diferentes linhagens de camundongos submetidas a um modelo de estresse (estresse crônico imprevisível) demonstrou que das duas linhagens de animais testadas, apenas a BALB/C apresentou comportamento anedônico no TBS, resposta não observada na linhagem Swiss, indicando que os camundongos Swiss apresentam uma menor sensibilidade ao estresse (YALCIN, BELZUNG e SURGET, 2008). Assim, postulamos que repetidos cruzamentos na colônia de animais, somado a evidências de menor sensibilidade desta linhagem ao estresse podem explicar, ao menos em partes, essa maior resistência à exposição crônica à corticosterona e consequente atenuação dos déficits comportamentais e neurogênicos associados a este modelo de estresse crônico.

Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, outros autores já demonstraram a ausência de resposta a exposição a corticosterona em relação a diferenciação neuronal. Em cultura de células progenitoras do hipocampo, *in vitro* através da técnica de reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa semiquantitativa (RT-PCR), foi observado que corticosterona em diferentes concentrações não diminui os níveis de mRNA do fator de transcrição NeuroD (YU *et al.*, 2004). Similar a nossos dados, também já foi demonstrado diminuição da proliferação celular (utilizando o marcador BrDU), tanto na subregião dorsal quanto ventral do hipocampo em camundongos submetidos ao modelo de administração crônica de corticosterona a, entretanto também não foram observadas alteração no número de neurônios imaturos (utilizando o marcador DCX) (CRUPI *et al.*, 2010; CRUPI *et al.*, 2011; RAINER *et al.*, 2012).

Recentemente, outro estudo utilizando três diferentes protocolos de administração crônica de corticosterona demonstrou que dois dos protocolos aplicados (implantação de pellets e injeção s.c.) não alteram a diferenciação neuronal (utilizando marcador DCX) (KOTT *et al.*, 2016). Já foi também demonstrado que administração crônica oral de corticosterona não altera nem a proliferação celular ou a diferenciação no GD do hipocampo (NACHER, GOMEZ-CLIMENT e MCEWEN, 2004). Tanti e Belzung (2013), em seu artigo de revisão, descrevem diferenças contraditórias na neurogênese em diferentes modelos animais de depressão, incluindo a administração crônica de corticosterona. Curiosamente, em alguns trabalhos foram obtidos efeitos contrastantes quanto à proliferação e sobrevivência. Além disso, os estudos observados são apenas correlativos e não permitem avaliar a participação causal dos neurônios recém-nascidos do hipocampo dorsal ou ventral no início do comportamento depressivo (TANTI e BELZUNG, 2013).

Outra hipótese que poderia elucidar os efeitos da exposição crônica à corticosterona em reduzir apenas a proliferação celular, sem alterar a diferenciação neuronal, pode ser explicado na possibilidade da corticosterona estar afetando apenas as células do tipo 2a. Uma vez que, existem dois tipos de células em proliferação que compõem o nicho de células tronco no GD, as células do tipo 2a, que irão manter a taxa celular de auto-renovação e manter o nicho de células tronco nesta região, enquanto que as células do tipo 2b são progenitores intermediários e podem dar origem aos neurônios (GONÇALVES, SCHAFER e GAGE, 2016).

No entanto, e de acordo com estudos anteriores (PAZINI et al., 2016), o antidepressivo clássico fluoxetina aumentou significativamente o comprometimento neuronal (isto é, o número de células NeuroD-positivas) e diferenciação (ou seja, o número de neuroblastos DCX-positivos) tanto nas subregiões dorsal e ventral do GD do hipocampo. O tratamento com fluoxetina tem sido capaz de recrutar novos neurônios e restaurar a disfunção do eixo HPA induzida pelo estresse crônico (SURGET *et al.*, 2011). O fato deste antidepressivo aumentar a proliferação celular e diferenciação neuronal não apenas na região ventral, mas também na região dorsal reflete os efeitos comportamentais promovidas pelo tratamento com este antidepressivo. De fato, já foi demonstrado que tanto o efeito antidepressivo da fluoxetina (relacionado a subregião ventral) (MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003; KLOMP *et al.*, 2014), quanto seus efeitos benéficos na memória (relacionados a subregião dorsal) (LYONS et al., 2011; WELBAT et al., 2016) estão associados a alterações morfológicas hipocâmpais.

A agmatina também foi capaz de aumentar significativamente a diferenciação neuronal (isto é, o número de células DCX positivas) ao longo de todo o eixo hipocâmpal (ou seja, subregiões dorsal e ventral do hipocampo), indicando que este composto é dotado de propriedades pró-neurogênicas. De maneira similar à fluoxetina, as alterações morfológicas em ambas as subregiões hipocâmpais promovidas pela agmatina podem estar relacionados aos efeitos comportamentais antidepressivos (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2014b; NEIS *et al.*, 2014a) e de melhora da memória (ARTENI *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2014; NEIS *et al.*, 2016b) apresentados por este composto.

Além de avaliar a influência dos tratamentos no número de células diferenciadas em neurônios, também foi investigado o efeito do tratamento na arborização e comprimento dendrítico, utilizando a análise de Sholl modificada (RISTANOVIC, MILOSEVIC e STULIC, 2006). O tratamento crônico com ambos compostos, agmatina e fluoxetina, além de promover o aumento do número de células DCX positivas, também foram capazes de aumentar a arborização e comprimento dendrítico destes novos neurônios. Corroborando com nossos dados, Wang et al (2008) demonstraram aumento da arborização dendrítica em células DCX positivas somente após o tratamento crônico (28 dias) com fluoxetina, o que não foi observado com o tratamento subcrônico (5 dias) (WANG *et al.*, 2008).

A partir dos dados aqui apresentados e de outros resultados da literatura, pode-se afirmar que a ação da fluoxetina no processo de

neurogênese adulta é múltipla. Primeiramente o tratamento crônico com este fármaco aumenta a proliferação de células progenitoras (MALBERG *et al.*, 2000; ENCINAS, VAAHTOKARI e ENIKOLOPOV, 2006), além de estimular a ramificação dendrítica e facilitar a maturação de células diferenciadas, o que consequentemente facilita a sobrevivência dos neurônios jovens. Em última instância esses neurônios integram-se funcionalmente às redes hipocampais e produzem a plasticidade sináptica a longo prazo (SANTARELLI *et al.*, 2003). Estas informações sugerem que o tratamento crônico com fluoxetina acelera a maturação das propriedades funcionais dos novos neurônios formados, o que parece contribuir significativamente para o eficácia desta, uma vez que existe uma relação temporal entre esta fase da maturação e o surgimento do seu efeito terapêutico (BERTON e NESTLER, 2006). Uma hipótese para esta ação é que não apenas o aumento do número celular, mas o aumento da complexidade dendrítica tenha papel central no aumento da potenciação de longa duração (LTP) destas células. Outro mecanismo possível é que a fluoxetina também pode aumentar a LTP mais rapidamente do que seria o processo normal, e acelerar a saída destas células do período crítico de sobrevivência (WANG *et al.*, 2008).

Têm sido postulado que estes efeitos de promoção da maturação e plasticidade sináptica exercidos pela fluoxetina sejam mediados por fatores neurotróficos, especialmente o BDNF, bem como a ativação de seu respectivo receptor TrkB, que é aumentada pela fluoxetina. Esta ativação de TrkB pode ser modulada via aumento de monoaminas (RANTAMAKI *et al.*, 2007; CASTREN e RANTAMAKI, 2010).

Além de reforçar este efeito do antidepressivo clássico fluoxetina, é importante destacar entre os nossos resultados o efeito da agmatina em aumentar a complexidade dendrítica, uma vez que é pela primeira vez relatado na literatura, e reforça subsídios para o efeito antidepressivo desta amina que vem sendo observado há tempos. Aqui foi demonstrado que agmatina tanto promoveu o aumento da arborização quanto aumentou o comprimento dos dendritos tanto quando analisado a soma das duas subregiões hipocampais (dorsal e ventral), ou quando apenas observado na região ventral (relacionada à emoções). Este efeito, especialmente na porção ventral é crucial pois, o aumento da arborização dendrítica favorece o aumento da conectividade dos novos neurônios na circuitaria neuronal hipocampal já existente, mecanismo decisivo e essencial para a funcionalidade e sobrevivência destes (OVERSTREET-WADICHE e WESTBROOK, 2006).

Os mecanismos pelos quais a agmatina é capaz de exercer o aumento na complexidade dendrítica de neurônios imaturos ainda não estão claros. Entretanto, postula-se que algumas alterações neuroquímicas e moleculares que podem estar envolvidas no efeito antidepressivo deste composto. Assim como a fluoxetina, a agmatina é capaz de aumentar os níveis de monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina) no hipocampo (TAKSANDE *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2015). Em concordância com estes resultados, a agmatina é capaz de potencializar o efeito de antidepressivos convencionais como a fluoxetina, imipramina e bupropiona, os quais tem seu mecanismo de ação baseado principalmente no aumento da biodisponibilidade de monoaminas (NEIS *et al.*, 2015).

Adicionalmente já foi demonstrado que a ativação dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT1A parece estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo da agmatina (ZOMKOWSKI *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2008), ao passo que a ativação deste subtipo de receptor está relacionada ao aumento da neurogênese hipocampal (SANTARELLI *et al.*, 2003), uma vez que seu bloqueio acarreta em uma diminuição da proliferação de células progenitoras hipocampais (RADLEY e JACOBS, 2002). Este efeito neurogênico via ativação de receptores 5-HT1A pode ser, pelo menos em parte, devido a ativação desses receptores nos astrócitos localizados na ZSG, que podem regular a liberação de fatores neurotróficos (AZMITIA *et al.*, 1996; MANEV, UZ e MANEV, 2001).

Já foi demonstrado o envolvimento da neurotrophina BDNF nos efeitos comportamentais da agmatina. O tratamento crônico com agmatina (0,1 mg/kg, 21 dias, mesma dose e tempo utilizado no presente trabalho) promoveu aumento da expressão de BDNF no hipocampo (FREITAS *et al.*, 2014a). Corroborando este resultado, na presença do anticorpo anti-BDNF ou de um antagonista do receptor TrkB o efeito tipo-antidepressivo da agmatina foi abolido (NEIS *et al.*, 2016b). Juntos, estes dados sugerem que possivelmente, o efeito positivo na modulação da plasticidade hipocampal apresentado pelo tratamento crônico com agmatina pode ser via interação com o sistema monoaminérgico com consequente aumento de BDNF. Entretanto maiores investigações sobre os mecanismos de ação pelos quais a agmatina aumenta a plasticidade hipocampal são necessários.

Este estudo reforça a propriedade antidepressiva da agmatina, já relatada em estudos prévios e a relaciona com seu efeito pró neurogênico. Levando em consideração que o tratamento disponível para depressão atualmente é insatisfatório, pois produz diversos efeitos

colaterais, podendo reduzir a adesão dos pacientes ao tratamento, além da baixa taxa de resposta que proporciona (BERTON e NESTLER, 2006), o desenvolvimento de terapias antidepressivas mais eficazes ou com menos efeitos adversos que integram atividade pró-neurogênica, melhora da integração sináptica e remissão dos sintomas, é fundamental. Além disso, agmatina, é um composto de baixa toxicidade já utilizado na clínica para o tratamento da dor neuropática (KEYNAN *et al.*, 2010), por este motivo postula-se que pode vir a se constituir uma possível estratégia terapêutica para a depressão.

8 CONCLUSÃO

- A administração crônica de corticosterona (20 mg/kg, 21 dias) produziu um aumento no tempo de imobilidade no TSC, sem alterações na atividade locomotora dos animais, evidenciando que este protocolo é capaz de induzir um comportamento tipo-depressivo nos animais.
- A administração crônica de agmatina (0,1 mg/kg) foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC, sem alterações na atividade locomotora dos animais, evidenciando o efeito-tipo antidepressivo da agmatina frente a um modelo de estresse crônico.
- A administração crônica de corticosterona diminuiu a proliferação celular na ZSG no GD do hipocampo sem diminuir a diferenciação neuronal.
- A administração crônica de agmatina aumentou a proliferação celular, a migração neuronal e a complexidade dendrítica dos novos neurônios gerados ZSG no GD do hipocampo. Estes resultados indicam a habilidade deste composto em modular a plasticidade neuronal e atuar como um agente pró-neurogênico.
- A fluoxetina, um antidepressivo clássico utilizada neste estudo como controle positivo, foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pela corticosterona. Associado a este efeito comportamental a fluoxetina foi capaz de reverter a diminuição de proliferação celular na ZSG no GD do hipocampo. A fluoxetina também aumentou significativamente a diferenciação e migração neuronal, assim como a complexidade dendrítica.

PERSPECTIVAS

- Avaliar se a agmatina aumenta a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo de camundongos adultos.
- Avaliar a capacidade da agmatina de influenciar a LTP em decorrência do seu efeito pró-neurogênico.
- Avaliar o possível efeito pró-neurogênico sinérgico advindo da combinação de doses sub-efetivas de agmatina e fluoxetina.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, C. G. *et al.* . Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. *Annu Rev Med*, v. 66, p. 509-23, 2015.

ABE, K.; ABE, Y.; SAITO, H. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res*, v. 872, n. 1-2, p. 141-8, 2000.

ABROUS, D. N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, v. 85, n. 2, p. 523-69, 2005.

ADAMS, G. C. *et al.* . When social anxiety and depression go together: A population study of comorbidity and associated consequences. *J Affect Disord*, v. 206, p. 48-54, 2016.

AHN, S. K. *et al.* . Protective effects of agmatine on lipopolysaccharide-injured microglia and inducible nitric oxide synthase activity. *Life Sciences*, v. 91, n. 25-26, p. 1345-50, 2012.

ALI, S. H. *et al.* . Resveratrol ameliorates depressive-like behavior in repeated corticosterone-induced depression in mice. *Steroids*, v. 101, p. 37-42, 2015.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, v. 207, n. 5000, p. 953-6, 1965.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, v. 22, n. 3, p. 629-34, 2002.

ANACKER, C. *et al.* . The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, v. 36, n. 3, p. 415-25, 2011.

APPLE, D. M.; FONSECA, R. S.; KOKOVAY, E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders. *Brain Res*, v. 1655, p. 270-276, 2017.

ARICIOGLU, F. *et al.* . Effect of agmatine on electrically and chemically induced seizures in mice. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1009, p. 141-6, 2003.

ARTENI, N. S. *et al.* . Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. *Neurobiol Learn Mem*, v. 78, n. 2, p. 465-9, 2002.

AZMITIA, E. C. *et al.* . Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology*, v. 14, n. 1, p. 35-46, 1996.

BANNERMAN, D. M. *et al.* . Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 28, n. 3, p. 273-83, 2004.

BATH, K. G. *et al.* . BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 5, p. 1297-304, 2012.

BAXTER, A. J. *et al.* . Global epidemiology of mental disorders: what are we missing? *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e65514, 2013.

BEN HAIM, L. *et al.* . Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*, v. 9, p. 278, 2015.

BENCE, A. K. *et al.* . An in vivo evaluation of the antiseizure activity and acute neurotoxicity of agmatine. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 74, n. 3, p. 771-5, 2003.

BERGIN, D. H.; LIU, P. Agmatine protects against beta-amyloid25-35-induced memory impairments in the rat. *Neuroscience*, v. 169, n. 2, p. 794-811, 2010.

BERNSTEIN, H. G. *et al.* . Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 237-46, 2012.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BESSA, J. M. *et al.* . The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry*, v. 14, n. 8, p. 764-73, 739, 2009.

BETTIO, L. E. *et al.* . The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation. *Eur J Neurosci*, v. 43, n. 8, p. 1006-15, 2016.

BHATTACHARYYA, B. J. *et al.* . The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates GABAergic inputs to neural progenitors in the postnatal dentate gyrus. *J Neurosci*, v. 28, n. 26, p. 6720-30, 2008.

BRAUN, S. M.; JESSBERGER, S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development*, v. 141, n. 10, p. 1983-6, 2014.

BROWN, J. P. *et al.* . Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, v. 467, n. 1, p. 1-10, 2003.

BRUNELLO, N. *et al.* . The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 12, n. 5, p. 461-75, 2002.

BUDNI, J. *et al.* . Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, v. 575, n. 1-3, p. 87-93, 2007.

CAMERON, H. A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, v. 61, n. 2, p. 203-9, 1994.

CAMERON, H. A. *et al.* . Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, v. 56, n. 2, p. 337-44, 1993.

CASTREN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol*, v. 4, n. 1, p. 58-64, 2004.

CASTREN, E.; RANTAMAKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*, v. 70, n. 5, p. 289-97, 2010.

CHEN, B. *et al.* . Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.

CHEN, F. *et al.* . Hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity accounts for anxiety- and depression-like behaviors in rats perinatally exposed to bisphenol A. *J Biomed Res*, v. 29, n. 3, p. 250-8, 2015.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, v. 30, n. 2, p. 271-81, 2014.

CHEN, Z. Y. *et al.* . Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci*, v. 24, n. 18, p. 4401-11, 2004.

CHRISTIE, B. R.; CAMERON, H. A. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus*, v. 16, n. 3, p. 199-207, 2006.

CONDELLO, S. *et al.* . Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF-kappaB activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, v. 116, n. 1, p. 67-75, 2011.

COUILLARD-DESPRES, S. *et al.* . Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis? *Curr Mol Med*, v. 1, n. 6, p. 677-88, 2001.

COUILLARD-DESPRES, S. *et al.* . Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci*, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2005.

CRUPI, R. *et al.* . Hypericum perforatum treatment: effect on behaviour and neurogenesis in a chronic stress model in mice. *BMC Complement Altern Med*, v. 11, p. 7, 2011.

CRUPI, R. *et al.* . Melatonin treatment mimics the antidepressant action in chronic corticosterone-treated mice. *J Pineal Res*, v. 49, n. 2, p. 123-9, 2010.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

CUIJPERS, P.; SMIT, F. Excess mortality in depression: a meta-analysis of community studies. *J Affect Disord*, v. 72, n. 3, p. 227-36, 2002.

DALLMAN, M. F. *et al.* . Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *Prog Brain Res*, v. 153, p. 75-105, 2006.

DAS I, D. B. J., ESSALI MA, RICHARDSON-ANDREWS RC, HIRSCH SR. . Blood polyamines in schizophrenia. *Schizophrenia Research* n. 2:.. p. 146, 1989.

DE KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 6, n. 6, p. 463-75, 2005.

DE KLOET, E. R. *et al.* . Stress and Depression: a Crucial Role of the Mineralocorticoid Receptor. *J Neuroendocrinol*, v. 28, n. 8, 2016.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res*, v. 1001, n. 1-2, p. 60-71, 2004.

DEMEHRI, S. *et al.* . Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha 2-adrenoceptors and nitric oxide. *Neuropharmacology*, v. 45, n. 4, p. 534-42, 2003.

DEMUYSER, T. *et al.* . Disruption of the HPA-axis through corticosterone-release pellets induces robust depressive-like behavior and reduced BDNF levels in mice. *Neurosci Lett*, v. 626, p. 119-25, 2016.

DEMYTTENAERE, K. Compliance during treatment with antidepressants. *J Affect Disord*, v. 43, n. 1, p. 27-39, 1997.

ZOMKOWSKI, A. *et al.* . Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res*, v. 1023, n. 2, p. 253-63, 2004.

DINIZ, L. *et al.* . Effects of chronic treatment with corticosterone and imipramine on fos immunoreactivity and adult hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res*, v. 238, p. 170-7, 2013.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1136-43, 2006.

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*, v. 11, n. 2, p. 240-9, 2001.

DSM-V. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th Ed. . American Psychiatric Publishing,, 2013.

DUMAN, R. S. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. *Depress Anxiety*, v. 31, n. 4, p. 291-6, 2014.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1116-27, 2006.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci*, v. 35, n. 1, p. 47-56, 2012.

EGAN, M. F. *et al.* . The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, v. 112, n. 2, p. 257-69, 2003.

ENCINAS, J. M.; VAAHTOKARI, A.; ENIKOLOPOV, G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 21, p. 8233-8, 2006.

ERIKSSON, P. S. *et al.* . Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, v. 4, n. 11, p. 1313-7, 1998.

ESPOSITO, M. S. *et al.* . Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, v. 25, n. 44, p. 10074-86, 2005.

FAIRBANKS, C. A. *et al.* . Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 19, p. 10584-9, 2000.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.

FENG, Y.; HALARIS, A. E.; PILETZ, J. E. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, v. 691, n. 2, p. 277-86, 1997.

FENTON, E. Y. *et al.* . Imipramine protects against the deleterious effects of chronic corticosterone on depression-like behavior, hippocampal reelin expression, and neuronal maturation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 60, p. 52-9, 2015.

FERRARI, A. J. *et al.* . Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. PLoS Med, v. 10, n. 11, p. e1001547, 2013.

FRANCIS, F. *et al.* . Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. Neuron, v. 23, n. 2, p. 247-56, 1999.

FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. N Engl J Med, v. 251, n. 25, p. 1006-8, 1954.

FREITAS, A. E. *et al.* . Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. J Psychiatr Res, v. 58, p. 137-46, 2014a.

FREITAS, A. E. *et al.* . Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 50, p. 143-50, 2014b.

FREITAS, A. E. *et al.* . Agmatine, by Improving Neuroplasticity Markers and Inducing Nrf2, Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. Mol Neurobiol, v. 53, n. 5, p. 3030-45, 2016.

FREITAS, A. E. *et al.* . Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line. Mol Neurobiol, v. 51, n. 3, p. 1504-19, 2015.

FREITAS, A. E.; NEIS, V. B.; RODRIGUES, A. L. Agmatine, a potential novel therapeutic strategy for depression. Eur Neuropsychopharmacol, 2016.

FURMARK, T. *et al.* . Common changes in cerebral blood flow in patients with social phobia treated with citalopram or cognitive-behavioral therapy. *Arch Gen Psychiatry*, v. 59, n. 5, p. 425-33, 2002.

GALAND, P.; DEGRAEF, C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet*, v. 22, n. 5, p. 383-92, 1989.

GALEA, E. *et al.* . Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J*, v. 316 (Pt 1), p. 247-9, 1996.

GAO, Z. *et al.* . Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci*, v. 12, n. 9, p. 1090-2, 2009.

GATT, J. M. *et al.* . Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry*, v. 14, n. 7, p. 681-95, 2009.

GAWALI, N. B. *et al.* . Agmatine ameliorates lipopolysaccharide induced depressive-like behaviour in mice by targeting the underlying inflammatory and oxido-nitrosative mediators. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 149, p. 1-8, 2016.

GE, S. *et al.* . GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, v. 439, n. 7076, p. 589-93, 2006.

GE, S. *et al.* . A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, v. 54, n. 4, p. 559-66, 2007.

GIGANTE, A. D. *et al.* . Morphometric post-mortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 14, n. 8, p. 1075-89, 2011.

GIL-MOHAPEL, J. *et al.* . Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e75125, 2013.

GILAD, G. M. *et al.* . Polyamines and their metabolizing enzymes in human frontal cortex and hippocampus: preliminary measurements in affective disorders. *Biol Psychiatry*, v. 38, n. 4, p. 227-34, 1995.

GILAD, G. M. *et al.* . Neurochemical evidence for agmatine modulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity. *Neurochem Res*, v. 30, n. 6-7, p. 713-9, 2005.

GILAD, G. M. *et al.* . Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. *Life Sci*, v. 58, n. 2, p. PL 41-6, 1996a.

_____. Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. *Life Sciences*, v. 58, n. 2, p. PL 41-6, 1996b.

GLEESON, J. G. *et al.* . Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, v. 92, n. 1, p. 63-72, 1998.

GLEESON, J. G. *et al.* . Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, v. 23, n. 2, p. 257-71, 1999.

GONCALVES, J. T.; SCHAFFER, S. T.; GAGE, F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, v. 167, n. 4, p. 897-914, 2016.

GONG, M. J. *et al.* . Icaritin reverses corticosterone-induced depression-like behavior, decrease in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and metabolic network disturbances revealed by NMR-based metabolomics in rats. *J Pharm Biomed Anal*, v. 123, p. 63-73, 2016.

GONG, Z. H. *et al.* . Anxiolytic effect of agmatine in rats and mice. *Eur J Pharmacol*, v. 550, n. 1-3, p. 112-6, 2006.

GORACHE-POSTLE, C. J. *et al.* . Release of tritiated agmatine from spinal synaptosomes. *Neuroreport*, v. 17, n. 1, p. 13-7, 2006.

GOSHEN, I. *et al.* . Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*, v. 13, n. 7, p. 717-28, 2008.

GOULD, E. *et al.* . Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*, v. 12, n. 9, p. 3642-50, 1992.

GOULD, E. *et al.* . Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, v. 17, n. 7, p. 2492-8, 1997.

GOULD, E. *et al.* . Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 6, p. 3168-71, 1998.

GREGUS, A. *et al.* . Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res*, v. 156, n. 1, p. 105-14, 2005.

HAENISCH, B. *et al.* . Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 295, n. 5, p. G1104-10, 2008.

HALARIS, A.; PLIETZ, J. Agmatine : metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs*, v. 21, n. 11, p. 885-900, 2007.

HALARIS, A. *et al.* . Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. *Ann N Y Acad Sci*, v. 881, p. 445-51, 1999.

HARRISON, P. J. The neuropathology of primary mood disorder. *Brain*, v. 125, n. Pt 7, p. 1428-49, 2002.

HELLSTEN, J. *et al.* . Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment. *Eur J Neurosci*, v. 16, n. 2, p. 283-90, 2002.

HILL, A. S.; SAHAY, A.; HEN, R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 10, p. 2368-78, 2015.

HU, P. *et al.* . A single-day treatment with mifepristone is sufficient to normalize chronic glucocorticoid induced suppression of hippocampal cell proliferation. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e46224, 2012.

HUANG, M. J. *et al.* . Structure-activity analysis of guanidine group in agmatine for brain agmatinase. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1009, p. 52-63, 2003.

HUNSBERGER, J. G. *et al.* . Cellular mechanisms underlying affective resiliency: the role of glucocorticoid receptor- and mitochondrially-mediated plasticity. *Brain Res*, v. 1293, p. 76-84, 2009.

INO, H.; CHIBA, T. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 78, n. 1-2, p. 163-74, 2000.

JACOBSON, L. H.; CRYAN, J. F. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. *Behav Genet*, v. 37, n. 1, p. 171-213, 2007.

JIANG, X. Z. *et al.* . [5-HT1A/1B receptors, alpha2-adrenoceptors and the post-receptor adenylate cyclase activation in the mice brain are involved in the antidepressant-like action of agmatine]. *Yao Xue Xue Bao*, v. 43, n. 5, p. 467-73, 2008.

KANG, S. *et al.* . Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. *Neuropharmacology*, v. 113, n. Pt A, p. 467-479, 2017.

KANG, W.; HEBERT, J. M. FGF Signaling Is Necessary for Neurogenesis in Young Mice and Sufficient to Reverse Its Decline in Old Mice. *J Neurosci*, v. 35, n. 28, p. 10217-23, 2015.

KAREGE, F. *et al.* . Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*, v. 109, n. 2, p. 143-8, 2002.

KEE, N. *et al.* . The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*, v. 115, n. 1, p. 97-105, 2002.

KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp*, v. 231, p. 220-35; discussion 235-41, 302-6, 2000.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, v. 386, n. 6624, p. 493-5, 1997.

KENDLER, K. S. *et al.* . Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety. *Arch Gen Psychiatry*, v. 60, n. 8, p. 789-96, 2003.

KEYNAN, O. *et al.* . Safety and Efficacy of Dietary Agmatine Sulfate in Lumbar Disc-associated Radiculopathy. An Open-label, Dose-escalating Study Followed by a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Pain Med*, v. 11, n. 3, p. 356-68, 2010.

KIM, J. H. *et al.* . Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. *Exp Neurol*, v. 189, n. 1, p. 122-30, 2004.

KIM, J. Y. *et al.* . Agmatine Attenuates Brain Edema and Apoptotic Cell Death after Traumatic Brain Injury. *J Korean Med Sci*, v. 30, n. 7, p. 943-52, 2015.

KLOMP, A. *et al.* . Effects of chronic fluoxetine treatment on neurogenesis and tryptophan hydroxylase expression in adolescent and adult rats. *PLoS One*, v. 9, n. 5, p. e97603, 2014.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; CHAKI, S. Effects of ketamine and LY341495 on the depressive-like behavior of repeated corticosterone-injected rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 107, p. 20-3, 2013.

KOPIECZNA-GRZEBIENIAK, E.; GOSS, M. [The importance of regulation of endogenous methylarginine concentrations in clinical practice]. *Przegl Lek*, v. 62, n. 12, p. 1494-501, 2005.

KOTAGALE, N. R. *et al.* . Possible involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in antidepressant like effect of agmatine in rats. *Peptides*, v. 47, p. 7-11, 2013.

KOTIL, K. *et al.* . Investigation of the dose-dependent neuroprotective effects of agmatine in experimental spinal cord injury: a prospective randomized and placebo-control trial. *J Neurosurg Spine*, v. 4, n. 5, p. 392-9, 2006.

KOTT, J. M. *et al.* . Effectiveness of different corticosterone administration methods to elevate corticosterone serum levels, induce depressive-like behavior, and affect neurogenesis levels in female rats. *Neuroscience*, v. 312, p. 201-14, 2016.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KUKEKOV, V. G. *et al.* . Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*, v. 156, n. 2, p. 333-44, 1999.

KUMAR, S.; MONDAL, A. C. Neuroprotective, Neurotrophic and Anti-oxidative Role of *Bacopa monnieri* on CUS Induced Model of Depression in Rat. *Neurochem Res*, 2016.

KUO, J. R. *et al.* . Agmatine-promoted angiogenesis, neurogenesis, and inhibition of gliosis-reduced traumatic brain injury in rats. *J Trauma*, v. 71, n. 4, p. E87-93, 2011.

KUO, J. R. *et al.* . Resuscitation from experimental traumatic brain injury by agmatine therapy. *Resuscitation*, v. 75, n. 3, p. 506-14, 2007.

KURKI, P. *et al.* . Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res*, v. 166, n. 1, p. 209-19, 1986.

LANFUMEY, L. *et al.* . Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 32, n. 6, p. 1174-84, 2008.

LAVINSKY, D.; ARTENI, N. S.; NETTO, C. A. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behav Brain Res*, v. 141, n. 1, p. 19-24, 2003.

LEE, W. T. *et al.* . Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Brain Research*, v. 1281, p. 64-70, 2009.

LEPINE, J. P.; BRILEY, M. The increasing burden of depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*, v. 7, n. Suppl 1, p. 3-7, 2011.

LI, G. *et al.* . Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, v. 263, n. 5149, p. 966-9, 1994.

LI, Y. F. *et al.* . Agmatine increases proliferation of cultured hippocampal progenitor cells and hippocampal neurogenesis in chronically stressed mice. *Acta Pharmacol Sin*, v. 27, n. 11, p. 1395-400, 2006.

LI, Y. F. *et al.* . Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *European Journal of Pharmacology*, v. 469, n. 1-3, p. 81-88, 2003.

LYONS, L. *et al.* . Fluoxetine reverses the memory impairment and reduction in proliferation and survival of hippocampal cells caused by

methotrexate chemotherapy. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 215, n. 1, p. 105-15, 2011.

MAGARINOS, A. M. *et al.* . Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*, v. 16, n. 10, p. 3534-40, 1996.

MALBERG, J. E. *et al.* . Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, v. 20, n. 24, p. 9104-10, 2000.

MANEV, R.; UZ, T.; MANEV, H. Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100beta in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*, v. 420, n. 2-3, p. R1-2, 2001.

MANTOVANI, M. *et al.* . Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett*, v. 343, n. 1, p. 1-4, 2003.

MAYER, J. L. *et al.* . Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. *J Neuroendocrinol*, v. 18, n. 8, p. 629-31, 2006.

MAZURE, C. M. *et al.* . Adverse life events and cognitive-personality characteristics in the prediction of major depression and antidepressant response. *Am J Psychiatry*, v. 157, n. 6, p. 896-903, 2000.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 84, n. 3, p. 436-52, 2006.

MCEWEN, B. S. *et al.* . Adrenal steroids and plasticity of hippocampal neurons: toward an understanding of underlying cellular and molecular mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*, v. 13, n. 4, p. 457-82, 1993.

MCGEER, P. L.; YASOJIMA, K.; MCGEER, E. G. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, v. 86, p. 83-9, 2001.

MEYLAN, E. M. *et al.* . Involvement of the agmatinergetic system in the depressive-like phenotype of the *Crtc1* knockout mouse model of depression. *Transl Psychiatry*, v. 6, n. 7, p. e852, 2016.

MILLER, B. R.; HEN, R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol*, v. 30, p. 51-8, 2015.

MING, G. L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, v. 70, n. 4, p. 687-702, 2011.

MIYATA, T.; MAEDA, T.; LEE, J. E. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev*, v. 13, n. 13, p. 1647-52, 1999.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr*, v. 24, n. 2, p. 184-97, 2005.

MONTEGGIA, L. M. *et al.* . Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 29, p. 10827-32, 2004.

MORETTI, M. *et al.* . Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)). *Neurotox Res*, v. 28, n. 3, p. 222-31, 2015.

MORILAK, D. A.; FRAZER, A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 7, n. 2, p. 193-218, 2004.

MOURET, A. *et al.* . Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci*, v. 28, n. 45, p. 11511-6, 2008.

MUNHOZ, T. N. *et al.* . A nationwide population-based study of depression in Brazil. *J Affect Disord*, v. 192, p. 226-33, 2016.

MURRAY, F.; SMITH, D. W.; HUTSON, P. H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol*, v. 583, n. 1, p. 115-27, 2008.

MUSAZZI, L. *et al.* . The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. *Biol Psychiatry*, v. 73, n. 12, p. 1180-8, 2013.

MUSAZZI, L.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Functional and structural remodeling of glutamate synapses in prefrontal and frontal cortex induced by behavioral stress. *Front Psychiatry*, v. 6, p. 60, 2015.

NACHER, J.; GOMEZ-CLIMENT, M. A.; MCEWEN, B. Chronic non-invasive glucocorticoid administration decreases polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*, v. 370, n. 1, p. 40-4, 2004.

NEIS, V. B. *et al.* . Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 150-151, p. 108-114, 2016a.

NEIS, V. B. *et al.* . Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha is abolished by agmatine administration. *Behav Brain Res*, v. 261, p. 336-44, 2014a.

NEIS, V. B. *et al.* . Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha is abolished by agmatine administration. *Behavioural Brain Research*, v. 261, p. 336-344, 2014b.

NEIS, V. B. *et al.* . Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 26, n. 6, p. 959-71, 2016b.

NEIS, V. B. *et al.* . Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 130, p. 9-14, 2015.

NEMEROFF, C. B. The neurobiology of depression. *Sci Am*, v. 278, n. 6, p. 42-9, 1998.

NESTLER, E. J. *et al.* . Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, v. 15, n. 11, p. 7539-47, 1995.

OTAKE, K. *et al.* . Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res*, v. 787, n. 1, p. 1-14, 1998.

OVERSTREET-WADICHE, L. S.; WESTBROOK, G. L. Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*, v. 16, n. 3, p. 208-15, 2006.

PALMER, T. D. *et al.* . Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, v. 19, n. 19, p. 8487-97, 1999.

PATTWELL, S. S. *et al.* . The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, v. 32, n. 7, p. 2410-21, 2012.

PAXINOS, G. F., K. Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. . Elsevier, San Diego, CA. 2001.

PAZINI, F. L. *et al.* . Creatine Prevents Corticosterone-Induced Reduction in Hippocampal Proliferation and Differentiation: Possible Implication for Its Antidepressant Effect. *Mol Neurobiol*, 2016a.

PAZINI, F. L. *et al.* . Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Mol Neurobiol*, 2015.

_____. Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Mol Neurobiol*, v. 53, n. 10, p. 6818-6834, 2016b.

PILETZ, J. E. *et al.* . Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 17-18, p. 880-93, 2013.

PILETZ, J. E. *et al.* . Agmatine crosses the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1009, p. 64-74, 2003.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 88-109, 2008.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 20, n. 8, p. 1107-30, 2011.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAASCH, W. *et al.* . Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br J Pharmacol*, v. 133, n. 6, p. 755-80, 2001.

RADLEY, J. J.; JACOBS, B. L. 5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res*, v. 955, n. 1-2, p. 264-7, 2002.

RAINER, Q. *et al.* . Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 15, n. 3, p. 321-35, 2012.

RAMCHAND, C. N. *et al.* . Role of polyamines in the membrane pathology of schizophrenia. A study using fibroblasts from schizophrenic patients and normal controls. *Schizophr Res*, v. 13, n. 3, p. 249-53, 1994.

RANTAMAKI, T. *et al.* . Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-C γ signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, v. 32, n. 10, p. 2152-62, 2007.

REGUNATHAN, S. *et al.* . Agmatine (decarboxylated arginine) is synthesized and stored in astrocytes. *Neuroreport*, v. 6, n. 14, p. 1897-900, 1995.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Agmatine: a novel neurotransmitter? *Adv Pharmacol*, v. 42, p. 645-9, 1998a.

_____. Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors may be a novel neurotransmitter in brain. *J Auton Nerv Syst*, v. 72, n. 2-3, p. 80-5, 1998b.

_____. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 21, n. 5, p. 187-193, 2000a.

_____. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci*, v. 21, n. 5, p. 187-93, 2000b.

REIS, D. J.; YANG, X. C.; MILNER, T. A. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. *Neurosci Lett*, v. 250, n. 3, p. 185-8, 1998.

RESSLER, K. J.; MAYBERG, H. S. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci*, v. 10, n. 9, p. 1116-24, 2007.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, v. 255, n. 5052, p. 1707-10, 1992.

RICHARDSON-ANDREWS, R. C. A central role for the polyamines in the aetiology of schizophrenia. *Med Hypotheses*, v. 11, n. 2, p. 157-66, 1983.

RISTANOVIC, D.; MILOSEVIC, N. T.; STULIC, V. Application of modified Sholl analysis to neuronal dendritic arborization of the cat spinal cord. *J Neurosci Methods*, v. 158, n. 2, p. 212-8, 2006.

RODRIGUES, A. L. *et al.* . Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci*, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.

RODRIGUEZ, J. J. *et al.* . Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, v. 10, n. 9, p. 2994-3006, 1998.

ROSA, P. B. *et al.* . Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 127, p. 1-6, 2014.

ROY, N. S. *et al.* . In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med*, v. 6, n. 3, p. 271-7, 2000.

RUHE, H. G. *et al.* . Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. *J Affect Disord*, v. 137, n. 1-3, p. 35-45, 2012.

SAALTINK, D. J.; VREUGDENHIL, E. Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition? *Cell Mol Life Sci*, v. 71, n. 13, p. 2499-515, 2014.

SAHIN, C. *et al.* . Agmatine Reverses Sub-chronic Stress induced Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3) Activation and Cytokine Response in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 119, n. 4, p. 367-75, 2016.

SALARI, A. A.; BAKHTIARI, A.; HOMBERG, J. R. Activation of GABA-A receptors during postnatal brain development increases anxiety- and depression-related behaviors in a time- and dose-dependent manner in adult mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015.

SANABRIA, E. R.; SU, H.; YAARI, Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol*, v. 532, n. Pt 1, p. 205-16, 2001.

SANTARELLI, L. *et al.* . Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, v. 301, n. 5634, p. 805-9, 2003.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*, v. 57, n. 10, p. 925-35, 2000.

_____. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci*, v. 18, n. 10, p. 1344-6, 2015.

SATVAT, E. *et al.* . Location is everything: neurons born during fluoxetine treatment accumulate in regions that do not support spatial learning. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 4, p. 1627-33, 2012.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. 1965. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, v. 7, n. 4, p. 524-33; discussion 523-4, 1995.

SCHLOESSER, R. J.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H. K. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends Neurosci*, v. 35, n. 1, p. 36-46, 2012.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, v. 182, n. 3, p. 311-22, 2000.

SEKI, T. Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J Neurosci Res*, v. 70, n. 3, p. 327-34, 2002.

SEN, S. *et al.* . A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression. *Neuropsychopharmacology*, v. 28, n. 2, p. 397-401, 2003.

SERRETTI, A.; MANDELLI, L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry*, v. 71, n. 10, p. 1259-72, 2010.

SHAH, P. J. *et al.* . Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry*, v. 172, p. 527-32, 1998.

SHELIN, Y. I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry*, v. 54, n. 3, p. 338-52, 2003.

SHELIN, Y. I. *et al.* . Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 9, p. 3908-13, 1996.

SHIRAYAMA, Y. *et al.* . Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*, v. 22, n. 8, p. 3251-61, 2002.

SHOLL, D. A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, v. 87, n. 4, p. 387-406, 1953.

SHOPSIN, B. The clinical antidepressant effect of exogenous agmatine is not reversed by parachlorophenylalanine: a pilot study. *Acta Neuropsychiatr*, v. 25, n. 2, p. 113-8, 2013.

SIOPI, E. *et al.* . Anxiety- and Depression-Like States Lead to Pronounced Olfactory Deficits and Impaired Adult Neurogenesis in Mice. *J Neurosci*, v. 36, n. 2, p. 518-31, 2016.

SONG, J. *et al.* . Agmatine improves cognitive dysfunction and prevents cell death in a streptozotocin-induced Alzheimer rat model. *Yonsei Med J*, v. 55, n. 3, p. 689-99, 2014.

SPANSWICK, S. C.; EPP, J. R.; SUTHERLAND, R. J. Time-course of hippocampal granule cell degeneration and changes in adult neurogenesis after adrenalectomy in rats. *Neuroscience*, v. 190, p. 166-76, 2011.

STERU, L. *et al.* . The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STOCKMEIER, C. A. *et al.* . Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*, v. 56, n. 9, p. 640-50, 2004.

SU, R. B. *et al.* . Anticonvulsive effect of agmatine in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 77, n. 2, p. 345-9, 2004.

SURGET, A. *et al.* . Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*, v. 16, n. 12, p. 1177-88, 2011.

TAKSANDE, B. G. *et al.* . Agmatine attenuates lipopolysaccharide induced anorexia and sickness behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 132, p. 108-114, 2015.

TAKSANDE, B. G. *et al.* . Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. *Eur J Pharmacol*, v. 720, n. 1-3, p. 115-20, 2013.

TAKSANDE, B. G. *et al.* . Neuropeptide Y in the central nucleus of amygdala regulates the anxiolytic effect of agmatine in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 24, n. 6, p. 955-63, 2014.

TAKSANDE, B. G. *et al.* . Antidepressant like effect of selective serotonin reuptake inhibitors involve modulation of imidazoline receptors by agmatine. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 4, p. 415-24, 2009.

TANAPAT, P.; GALEA, L. A.; GOULD, E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*, v. 16, n. 3-4, p. 235-9, 1998.

TANTI, A.; BELZUNG, C. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience*, v. 252, p. 234-52, 2013.

TASHIRO, A. *et al.* . NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, v. 442, n. 7105, p. 929-33, 2006.

THARMARATNAM, T. *et al.* . Exercise becomes brain: sustained aerobic exercise enhances hippocampal neurogenesis. *J Physiol*, v. 595, n. 1, p. 7-8, 2017.

VAN PRAAG, H. *et al.* . Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, v. 415, n. 6875, p. 1030-4, 2002.

WANG, J. W. *et al.* . Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci*, v. 28, n. 6, p. 1374-84, 2008.

WANG, L. *et al.* . Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J Neurosci*, v. 35, n. 22, p. 8384-93, 2015.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, v. 588, n. 2, p. 341-5, 1992.

WATSON, S. *et al.* . Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*, v. 184, p. 496-502, 2004.

WELBAT, J. U. *et al.* . Fluoxetine prevents the memory deficits and reduction in hippocampal cell proliferation caused by valproic acid. *J Chem Neuroanat*, v. 78, p. 112-118, 2016.

WENG, L. *et al.* . Apigenin reverses depression-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Eur J Pharmacol*, v. 774, p. 50-4, 2016.

WOOLLEY, C. S.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, v. 531, n. 1-2, p. 225-31, 1990.

YALCIN, I.; BELZUNG, C.; SURGET, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res*, v. 193, n. 1, p. 140-3, 2008.

YAN, T. *et al.* . Schisandra chinensis produces the antidepressant-like effects in repeated corticosterone-induced mice via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway. *Psychiatry Res*, v. 243, p. 135-42, 2016.

YANG, X. C.; REIS, D. J. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 288, n. 2, p. 544-9, 1999a.

_____. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 288, n. 2, p. 544-9, 1999b.

YU, C. G. *et al.* . Effects of agmatine, interleukin-10, and cyclosporin on spontaneous pain behavior after excitotoxic spinal cord injury in rats. *J Pain*, v. 4, n. 3, p. 129-40, 2003.

YU, C. G. *et al.* . Agmatine improves locomotor function and reduces tissue damage following spinal cord injury. *Neuroreport*, v. 11, n. 14, p. 3203-7, 2000.

YU, I. T. *et al.* . Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 317, n. 2, p. 484-90, 2004.

ZEIDAN, M. P. *et al.* . Evidence for imidazoline receptors involvement in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, v. 565, n. 1-3, p. 125-31, 2007.

ZHANG, K. *et al.* . Baicalin promotes hippocampal neurogenesis via SGK1- and FKBP5-mediated glucocorticoid receptor phosphorylation in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Sci Rep*, v. 6, p. 30951, 2016a.

ZHANG, K. *et al.* . Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *J Ethnopharmacol*, v. 194, p. 674-683, 2016b.

ZHANG, L. *et al.* . The BDNF Val66Met Polymorphism Interacts with Maternal Parenting Influencing Adolescent Depressive Symptoms: Evidence of Differential Susceptibility Model. *J Youth Adolesc*, v. 45, n. 3, p. 471-83, 2016.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, v. 132, n. 4, p. 645-60, 2008.

ZHAO, C. *et al.* . Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, v. 26, n. 1, p. 3-11, 2006.

ZHAO, Y. *et al.* . A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur J Pharmacol*, v. 581, n. 1-2, p. 113-20, 2008.

ZHAO, Y. *et al.* . The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. *Brain Res*, v. 1261, p. 82-90, 2009.

ZHOU, Q. G. *et al.* . Regional-specific effect of fluoxetine on rapidly dividing progenitors along the dorsoventral axis of the hippocampus. *Sci Rep*, v. 6, p. 35572, 2016.

ZOMKOWSKI, A. D. *et al.* . Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*, v. 13, n. 4, p. 387-91, 2002.

ZOMKOWSKI, A. D.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett*, v. 381, n. 3, p. 279-83, 2005.

ARTIGAS, F. *et al.* . Adaptative changes of the serotonergic system after antidepressant treatments. **Adv Exp Med Biol**, v. 398, p. 51-9, 1996.

DEVERTEUIL, R. L.; LEHMANN, H. E. Therapeutic trial of iproniazid (marsilid) in depressed and apathetic patients. **Can Med Assoc J**, v. 78, n. 2, p. 131-3, 1958.

MATHEUS, F. C. *et al.* . Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behav Brain Res**, v. 235, n. 2, p. 263-72, 2012.

MORETTI, M. *et al.* . Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 3, p. 331-40, 2012.

MORETTI, M. *et al.* . Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)). **Neurotox Res**, v. 28, n. 3, p. 222-31, 2015.

PAXINOS, W. K. **The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy**. 1 ed. Elsevier, San Diego, CA.: 2010.

TANNENHOLZ, L.; JIMENEZ, J. C.; KHEIRBEK, M. A. Local and regional heterogeneity underlying hippocampal modulation of cognition and mood. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 147, 2014.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.